



BIBLIOTECA CENTRALĂ
UNIVERSITARĂ
București

Cota III 465533

Inventar 804/68

ELENA POPA

BIOCATALIZATORI IMOBILIZAȚI

VOLUMUL I

EDITURA UNIVERSITĂȚII BUCUREȘTI
— 1996 —



UNIVERSITARA
Bucuresti

Cota III 465533

Inventar 804/68

Referenți științifici: Prof. dr. Ovidiu MAIOR
Conf. dr. Alexandru GIOABA

Biblioteca Centrală Universitară	
BUCUREȘTI	
III 465533	
nota	
prezentar	804168

561/96

Toate drepturile sunt rezervate Editurii Universității București.
Orice reproducere sau traducere, fie și parțială, precum și
contrafacerile de orice tip intră sub incidența Codului Penal.

ISBN – 973 – 575 – 032 – 5

Fără a avea pretenția de a fi acoperit în totalitate tema extrem de vastă și de actuală a biocatalizatorilor imobilizați, prezenta lucrare (deocamdată prima de acest fel în limba română) se adresează în principal studenților biochimști.

Cursul, structurat în două volume prezintă metodele generale de imobilizare a biocatalizatorilor (enzime, celule, organele celulare etc.), proprietățile imobilizatorilor obținute ca și principalele direcții de aplicare practică a acestora.

Prezenta lucrare urmărește punerea în temă și familiarizarea viitorilor biochimști cu un domeniu fără de care nu se mai pot concepe astăzi procesele biotehnologice ca și cercetarea biochimică, farmaceutică sau medicală.

Structurat inițial pe programa cursului de „Enzime imobilizate” pentru studenții secției de Biochimie din Facultatea de Chimie a Universității București, materialul prezent are o extindere care depășește (din motive lesne de înțeles) numărul de ore de predare afectate acestui curs putând servi și studenților care frecventează secția de profil a formei de studii aprofundate.

Autoarea aduce pe această cale un pios omagiu amintirii Dr.Chim. Horst Schell, cel care i-a dezvăluit cu competență și generozitate domeniul atât de atractiv al enzimelor imobilizate.

Conf.Dr. Elena Popa

I.	IMOBILIZAREA ENZIMELOR	
	Generalități.....	11
I.1.	Metode fizice de imobilizare.....	17
I.1.1.	Adsorbția pe suporturi insolubile în apă.....	17
1°	Metodologie.....	18
2°	Suporturi.....	19
3°	Mecanismul adsorbției.....	23
I.1.1.1.	Factorii care influențează stabilitatea preparatelor de enzime adsorbite pe suport....	24
I.1.1.2.	Proprietățile enzimelor adsorbite pe suport...	27
I.1.1.3.	Metoda legării ionice.....	29
I.1.1.4.	Imobilizare prin complexare cu metale.....	32
I.1.2.	Includerea în geluri insolubile în apă.....	35
I.1.2.1.	Materiale și metode utilizate pentru includerea enzimelor în geluri.....	37
1°	Polimeri și copolimeri acrilici.....	37
2°	Gelul de amidon.....	44
3°	Cauciucul siliconic.....	44
4°	Fibrina.....	44
5°	Colagenul.....	45
6°	Polimeri anorganici.....	49
7°	Includerea în geluri folosind precursori oligomeri.....	50
8°	Folosirea polimerilor naturali la includerea unor molecule polimere cu masă mare.....	53
9°	Geluri utilizate la includere prin precipitare	55

I.1.2.2.	Considerații asupra activității enzimelor incluse în geluri.....	56
I.1.3.	Encapsularea.....	59
I.1.3.1.	Tehnici de encapsulare.....	61
I.1.3.2.	Tipuri de membrane semipermeabile.....	69
a)	Tipuri de membrane sintetice.....	69
b)	Tipuri de membrane biologice și biodegradabile...	74
I.1.4.	Imobilizarea enzimelor pe membrane de „Hollow-fiber ”.....	79
I.1.4.1.	Dispozitive de membrane de „Hollow-fiber ”.....	80
I.1.4.2.	Tipuri de membrane.....	83
I.1.4.3.	Tehnici de imobilizare a enzimelor pe membrane de „Hollow-fiber ”.....	88
A.	Imobilizarea enzimelor din soluții.....	88
B.	Imobilizarea cu enzime solubile modificate.....	89
C.	Imobilizarea cu suspensii de enzime.....	90
I.2.	Metode chimice de imobilizare a enzimelor (prin formare de legături covalente).....	91
I.2.1.	Fixarea enzimelor pe suporturi insolubile.....	95
I.2.1.1.	Suportul.....	96
I.2.1.2.	Tehnici de cuplare a enzimelor pe suporturi solide.....	103
A.	Condiții de cuplare.....	103
B.	Problema centrilor activi ai enzimelor.....	105
C.	Determinarea grupărilor angajate în cuplare cu suportul.....	106
D.	Suporturi activate chimic.....	107

I.2.1.3.	Imobilizarea enzimelor pe suporturi de polizaharide.....	108
1°	Agar și agaroză.....	109
2°	Activarea gelului de polizaharid reticulat.....	113
3°	Imobilizarea enzimelor pe suporturi de celuloză.....	126
4°	Imobilizare pe suporturi de amidon modificat.....	131
5°	Alcoolul polivinilic.....	133
6°	Reacția Ugi.....	133
I.2.2.	Imobilizarea covalentă a enzimelor pe polimeri și copolimeri sintetici.....	134
I.2.2.1.	Geluri pe bază de monomeri acrilici și metacrilici.....	135
1°	Polimerizarea (copolimerizarea) monomerilor acrilici.....	138
2°	Activarea chimică a suportului.....	139
3°	Legarea covalentă a enzimei pe suportul activat.....	141
A.	(Co)polimeri hidrofobi.....	142
B.	Geluri hidrofile.....	143
I.2.2.2.	Suporturi de copolimeri vinilici.....	151
I.2.2.3.	Suporturi poliamidice de tip Nylon.....	158
I.2.3.	Imobilizarea enzimelor prin reticulare (agregare).....	166
I.2.3.1.	Reticularea intramoleculară.....	166
I.2.3.2.	Reticularea intermoleculară.....	172
I.2.3.3.	Tehnici de reticulare.....	177
I.2.3.4.	Factori care influențează activitatea agregatelor de enzime reticulate.....	184

I.2.4.	Imobilizarea enzimelor prin legare covalentă pe suporturi anorganice.....	188
I.2.4.1.	Tehnica activării silanice.....	191
1°	Activarea alchil-aminosilanică.....	191
2°	Cuplarea enzimelor cu alchilaminosilano-derivatii suportului.....	193
3°	Cuplarea enzimelor cu derivați alchiltiosilaniei.....	198
4°	Cuplarea enzimelor cu derivați alchilhalosilaniei ai suportului.....	198
I.2.4.2.	Tehnica fixării enzimelor pe suporturi anorganice în absența agenților silaniei de cuplare.....	199
I.3.	Investigarea proprietăților fizice ale enzimelor imobilizate.....	203
I.3.1.	Heterogenitatea preparatelor de enzime imobilizate.....	205
I.3.2.	Proprietăți fizice investigate.....	208
I.4.	Metode chimice de caracterizare a enzimelor imobilizate.....	210
I.4.1.	Suportul ca reactiv chimic.....	210
I.4.2.	Determinarea randamentului de cuplare și a proteinei legate.....	212
I.4.3.	Determinarea centrilor activi ai enzimelor imobilizate.....	215
I.5.	Aspecte ale cineticii enzimelor imobilizate.....	217
1)	Efecte sterice și conformaționale.....	217
2)	Efecte de partiție.....	217
3)	Efecte de difuzie și de transfer de masă.....	218

I.5.1.	Parametrii care influențează cinetica reacțiilor cu enzime imobilizate.....	220
I.5.1.1.	Concentrația enzimei.....	220
I.5.1.2.	Temperatura.....	222
I.5.1.3.	Influența pH-ului.....	224
I.5.1.4.	Tăria ionică.....	225
I.5.1.5.	Concentrația produsului de reacție.....	226
I.5.1.6.	Viteza maximă de reacție.....	228
I.5.1.7.	Constanta Michaelis.....	228
I.5.1.8.	Concentrația substratului.....	232
I.5.1.9.	Concentrația inhibitorului.....	237
I.6.	Stabilitatea preparatelor de enzime imobilizate.....	239
II	IMOBILIZAREA SISTEMELOR ENZIMATICE MULTISECVENTIALE	244
II.1.	Considerații generale privind prepararea și utilizarea sistemelor enzimatic multisecvențiale imobilizate.....	245
II.1.1.	Alegerea suportului și a tehnicii de imobilizare	245
II.1.2.	Activitatea enzimelor.....	246
II.1.2.1.	Determinări de activitate.....	246
II.1.2.2.	Studii de pH.....	250
II.2.	Aspecte practice.....	251
II.2.1.	Utilizarea enzimelor co-imobilizate pe aceleași particule de suport.....	251
II.2.2.	Utilizarea preparatelor de enzime co-imobilizate pe particule separate de suport..	253

II.2.3.	Exemple de sisteme enzimatic multi- secvențiale co-imobilizate pe aceleași particule de suport.....	255
II.2.4.	Exemple de enzime co-imobilizate pe particule separate de suport.....	256
III.	SISTEME DE ENZIME SI COENZIME CO-IMOBILIZATE.	257
III.1.	Coenzimele catalitice.....	258
III.2.	Coenzimele stoechiometrice.....	258
III.3.	Co-imobilizarea enzimelor și coenzimelor.....	260
III.4.	Strategii în utilizarea co-imobilizatelor de enzime și coenzime.....	263
III.4.1.	Membrane speciale și coenzime native.....	263
III.4.2.	Membrane pentru coenzime cu masă moleculară mare.....	264
III.5.	Mecanismele reacțiilor enzimatic în prezența coenzimelor.....	265
III.6.	Metode de imobilizare a coenzimelor.....	266
III.7.	Exemple de aplicare a enzimelor și coenzimelor co-imobilizate.....	272
III.7.1.	Senzori enzimatici.....	272
III.7.2.	Reactoare enzimatic cu cofactori imobilizați	274
III.8.	Alte exemple de coenzime imobilizate.....	275
	Listă de abrevieri.....	278
	BIBLIOGRAFIA va fi specificată în vol. II	

I. IMOBILIZAREA ENZIMELOR

Generalități

Fixarea (imobilizarea) unei enzime sau a altei proteine pe o fază solidă conduce la aducți de mare interes practic, cu utilizare atât în laboratoarele de cercetare cât și în industrie, unde majoritatea proceselor tehnologice biochimice au la bază enzimele imobilizate pe suporturi.

Față de utilizarea enzimelor libere („solubile”) într-o sinteză biochimică, enzimele imobilizate pe suport solid prezintă numeroase avantaje:

- Dacă aducții sunt insolubili în apă, ei pot fi ușor recuperați din amestecul de reacție prin centrifugare sau filtrare.

- Enzimele imobilizate pe un suport solid pot fi plasate în reactori industriali folosiți în procesele cu flux continuu.

- Atașarea unei enzime pe o suprafață solidă conduce la creșterea stabilității sale (la acțiunea temperaturii, la pH, etc.). În natură enzimele nu reacționează în stare „liberă” în soluție, ci la interfața agregatelor solide din celule. Când o enzimă este izolată și purificată, ea este desprinsă de pe suprafața pe care era atașată, ceea ce o poate destabiliza. Astfel, fixarea enzimelor pe o suprafață solidă poate restabili în parte condițiile sterice de vecinătate în care ea rămâne activă.

- Factorul economic trebuie de asemenea luat în considerație în cazul utilizării enzimelor imobilizate pe suporturi solide.

* Se știe că izolarea și purificarea enzimelor din preparatele celulare este un proces laborios și costisitor; enzima

trebuie să fie deosebit de pură, mai ales atunci când este folosită în reacții în care se obțin produse alimentare, farmaceutice, cosmetice (produse cu acțiuni fiziologice). Utilizarea în reacții a unor enzime „libere” („solubile”) este limitată la o singură gară, enzima pierzându-se practic după terminarea conversiei și fiind îndepărtată în procesul de purificare a produsului acesteia.

Dacă însă enzima se utilizează sub formă imobilizată, agregatul (aductul) obținut poate fi refolosit la un ciclu de zece până la sute de reacții și poate fi recuperat la sfârșitul ciclului respectiv și supus reactivării.

Cu aceiași cantitate de enzimă se pot efectua deci un număr mare de reacții, ceea ce scade prețul de cost. În plus, procesele sunt continue și susceptibile de automatizare, deci pot fi adaptate unor cerințe industriale.

Mai mult decât atât, dacă se aleg suporturi convenabile, pe aceste suporturi pot fi imobilizate alături de enzime și coenzimele corespunzătoare reacțiilor efectuate.

De asemenea pe același suport pot fi imobilizate mai multe enzime corespunzând unor etape de reacții succesive, astfel încât cu agregatul respectiv se pot efectua mai multe asemenea reacții, ceea ce simplifică procesul tehnologic și duce la creșterea randamentului în produs final de reacție, prin eliminarea unor operații de separare și purificare a produșilor de reacție intermediari.

În tabelul nr. 1 sunt date exemple de suporturi utilizate frecvent pentru fixarea (fizică și chimică) a enzimelor.

Tabelul Nr. 1

Exemple de suporturi utilizate pentru imobilizarea
enzimelor

Adsorbanti anorganici	Adsorbanti organici
Alumină	Rășini schimbătoare de
Silice, nisip	ioni anionice (DEAE-celu-
TiO_2 , ZrO_2	loză etc.)
Bentonită	Rășini schimbătoare de
Sticlă	ioni cationice (CM-celuloză
Ceramică	etc.)
$CaCO_3$	Celuloză
Cărbune activ	Amidon și amidon modificat
Caolinit	(amidon dialdehidic etc.)
Hidroxiapatită	Sephadex
Oxid de nichel	Agar
Zirconiu poros	Agaroză
Oxid de fier	Alginat
Argile	
	Colagen
	Polimeri poliamidici (de tip
	Nylon)
	Poliaminostiren
	Copolimeri acrilici și
	metacrilici
	Copolimeri vinilici

Utilizarea agregatelor de enzime imobilizate prezintă și unele dezavantaje ca:

- Scăderea reactivității biocatalizatorului imobilizat față de cea a enzimei libere, deoarece prin fixare pe suport are loc o blocare parțială și o împiedicare sterică, ceea ce duce la îngreunarea accesului substratului la centrul activ al enzimei.

- Posibilitatea desprinderii enzimei de pe suport în cursul reacției, care are ca rezultat stoparea reacției și pierderea enzimei, ca și impurificarea produsului de reacție.

De aceea, procedeul de imobilizare ca și natura suportului solid trebuie alese cu grijă, în funcție de:

- natura enzimei (tipurile de grupări funcționale grefate lateral pe resturile de aminoacizi din lanțurile peptidice ale moleculei enzimei), masa moleculară a enzimei etc.;

- „activitatea remanentă” a enzimei fixată pe suportul solid trebuie să fie cât mai apropiată de cea a enzimei libere în condiții de reacție similare; ea se exprimă în procente, considerând în mod convențional că activitatea enzimei libere este de 100%;

- suportul solid ales trebuie să prezinte compatibilitate cu enzima, astfel încât procedeul de fixare să fie cât mai accesibil și să conserve pe cât posibil centrul activ al enzimei. Agregatul obținut trebuie să fie suficient de stabil la: stocare, variații de temperatură, pH, tărie ionică, acțiunea microorganismelor etc.

Metoda de imobilizare se alege de asemenea în funcție de: structura enzimei, a suportului ca și a substratului supus reacției enzimatică.

În afară de enzime pot fi imobilizate microorganisme, celule sau organite celulare.

Enzimele pot fi plasate pe suprafețe solide printr-o mare

varietate de metode de imobilizare, care pot fi clasificate în două mari categorii:

I.1. Metode fizice în care se includ toate procedeele de imobilizare care nu au ca rezultat formarea de legături covalente între enzimă și suport. Acestea sunt:

I.1.1. Adsorbția pe suport insolubil în apă;

I.1.2. Includerea într-un gel insolubil în apă;

I.1.3. Includerea în microcapsule semipermeabile permanente sau nepermanente;

I.1.4. Fixarea în membrane semipermeabile.

În această grupă, imobilizarea este dependentă de acțiunea forțelor fizice (interacții electrostatice, Van der Waals etc.)

În principiu, metodele fizice sunt reversibile mergând până la recuperarea în întregime a enzimei într-o stare activă.

I.2. Metode chimice în care se formează legături covalente între enzimă și suport. Si acestea se pot clasifica după cum urmează:

I.2.1. Fixarea pe suporturi insolubile în apă;

I.2.2. Încorporarea într-un polimer în timpul procesului de polimerizare;

I.2.3. Reticularea intermoleculară a enzimei cu agenți multifuncționali cu masă moleculară redusă.

I.2.4. Imobilizarea covalentă pe suporturi anorganice.

În toate aceste metode, procedeul de imobilizare are ca scop formarea în ultimă instanță a unei legături covalente (sau parțial covalente) între grupările funcționale libere ale enzimei și un suport activat, insolubil în apă, ori între două sau mai multe molecule (ca în cazul reticulării, unde suportul propriu-zis poate lipsi).

În realitate, se formează mai mult decât o legătură covalentă între reactanții uzuali.

Astfel, imobilizarea unei enzime prin cuplare cu un polimer insolubil se poate face fie prin tratarea sa cu un reactiv bifuncțional, fie prin incorporarea sa într-un lanț polimeric în cursul polimerizării.

Metodele chimice de imobilizare sunt ireversibile, iar enzima odată fixată pe suport nu mai poate fi recuperată. Recent, s-au elaborat și metode de imobilizare chimică reversibilă pe polimeri de tip aldehydic sau pe polimeri insolubili în apă, conținând grupări-SH.

În afară de aceste metode generale se cunosc și metode speciale de imobilizare, cu utilitate restrânsă, ca de exemplu: fotolimobilizarea sau fixarea pe suporturi magnetice.

Totuși nu trebuie trasată o graniță strictă între cele două mari tipuri generale de imobilizare a enzimelor. S-a observat astfel că chiar în cazul procedeelor reversibile de imobilizare, enzima nu se poate recupera total, sau se recuperează parțial inactivată. Acest lucru se atribuie faptului că majoritatea metodelor curente de imobilizare includ în același timp atât o legare chimică, cât și una fizică, gradul diferit de legare în cele două moduri fiind variabil și deci nu se poate face o delimitare strictă.

I.1. Metode fizice de imobilizare

I.1.1. Adsorbția pe suporturi insolubile în apă

În majoritatea opiniilor cercetătorilor, procedeul adsorbției apare drept metoda cea mai economică de imobilizare a unei enzime pe un suport.

Procedeul de imobilizare trebuie să fie simplu, stabilitatea unui preparat cu enzimă adsorbită depinzând de tăria legăturilor de natură fizică (electrostatice, legături de hidrogen, Van der Waals etc.) ce se formează în timpul imobilizării între enzimă și suport, ca și de posibilitatea ca în condițiile de reacție în care este folosit agregatul, aceste legături să se păstreze, recuperându-se final aductul de enzimă imobilizată.

Se definește adsorbția enzimelor pe un suport ca aderarea acestora la suprafața suportului prin orice legături specifice, în afară de legătura covalentă.

Prima imobilizare prin adsorbție a fost făcută de către Griffin și Nelson; în 1916 ei au imobilizat invertaza pe cărbune activ și pe gel de hidroxid de aluminiu.

Prima aplicație industrială cunoscută a acestui procedeu a fost hidroliza N-acetil-DL-aminoacizilor cu L-aminoacilaza (Tosa și colab., 1969).

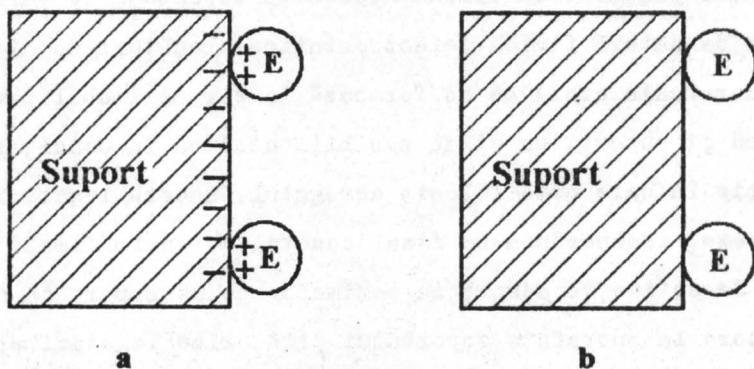
În 1974, Schnyder a imobilizat glucoizomeraza pe un schimbător de ioni (DEAE-celuloză).

Adsorbția enzimelor și a altor proteine se poate face la interfața aer-apă, apă-ulei sau apă-solid. Din nefericire nu se poate preciza dacă activitatea enzimei imobilizate prin adsorbție se datorește în întregime enzimei adsorbite sau și celei desorbite în cursul reacției, știind că procedeul de imobilizare este reversibil.

Schematizând imobilizarea fizică a enzimei (E) pe suport se pot reprezenta (în fig. 1) legăturile ionice (cazul a) sau neionice - adsorbția propriu-zisă (cazul b).

Fig. nr. 1

Moduri de legare fizică a enzimelor pe suporturi insolubile



Potrivit nomenclaturii propuse în actualul curs, vom înțelege prin „agregat”, „conjugat” sau „aduct” enzima imobilizată pe suport.

1. Metodologie

Din punct de vedere operațional, această metodă de imobilizare este relativ simplă. În genere, ea constă într-un contact al unei soluții apoase de enzimă (sau amestec de enzime) cu un adsorbant, urmată de spălarea agregatului rezultat în vederea recuperării enzimei neadsorbite.

Adsorbantii pot fi:

- organici: celuloză CMC-celuloză, DEAE-celuloză, collagen, colodiu (nitrat de celuloză), poliaminostiren, rășini

schimbătoare de ioni, sau

- anorganici: alumină, bentonită, CaCO_3 , silicagel, sticlă caolin, hidroxiapatită, TiO_2 etc. (Tabelul nr.1).

Mecanismul procesului de adsorbție poate fi destul de variat și este greu a se distinge între interacții ionice (dintre grupările încărcate cu sarcini opuse ale enzimei și suportului), legături de hidrogen etc.

Astfel, imobilizarea unei enzime pe sticlă poroasă poate fi datorată în parte includerii fizice a macromoleculelor proteinei în porii de dimensiuni corespunzătoare ai suportului.

Imobilizarea pe suporturi flexibile (colagen) poate fi datorată în parte capacității polimerului de a-și restrânge volumul.

Este posibil ca fixarea enzimei să reunească metoda adsorbției cu o metodă de modificare chimică a enzimei. Astfel, adsorbția unei enzime urmată de reticulare cu agenți bifuncționali (ca: glutaraldehidă) conduce la un agregat activ și insolubil în apă. Tratarea unei enzime adsorbite cu un reactiv bifuncțional are ca efect atât o reticulare intra- cât și una intermoleculară ambele fiind la fel de importante. Astfel, în timp ce reticularea intermoleculară conduce la formarea unei anvelope pe suport, cea intramoleculară poate mări stabilitatea conformațională a proteinei adsorbite.

2. Suporturi

Se pune întrebarea ce condiții trebuie să îndeplinească un material pentru a fi un bun suport față de enzime? Pentru a răspunde la întrebare trebuie reconsiderată și definită noțiunea de suport, clasificându-se suporturile după proprietățile lor.

Suporturile trebuie să îndeplinească mai multe condiții fundamentale:

- să fie stabile în condițiile de utilizare (pH, tărie ionică, temperatură etc.);
- să aibă o solubilitate foarte redusă în mediul în care sunt utilizate, în caz contrar enzima putându-se desprinde ușor de pe suport.

Clasificarea suporturilor în organice și anorganice nu ține seama de morfologia lor. De aceea, cea mai adecvată clasificare a lor în scopul obținerii de enzime imobilizate este după porozitate și anume:

- a) Suporturi neporoase.
- b) Suporturi poroase - cu pori de mărime controlată;
 - cu o largă distribuție a porilor;
- c) Suporturi cu structură de gel - geluri preformate;
 - geluri de incluziune;
 - copolimeri.

Suporturile cu asemenea morfologie de bază se pot prezenta într-o mare varietate de forme și configurații. De exemplu, același tip de suport poate avea formă de: sfere (perle), fibre, membrane, folii, filamente etc.

a) Suporturile neporoase au un dezavantaj major: aria suprafeței este foarte mică și deci și suprafața disponibilă pentru legarea enzimei va fi foarte redusă. Pentru legarea enzimelor, se impune deci utilizarea unor particule sau fibre foarte fine care prezintă dezavantajul că se îndepărtează greu din amestecul de reacție.

Există și materiale neporoase ca nylonul care au marele avantaj că sunt compatibile cu sângele (material cu caracter

bazic și suprafață foarte mică).

Un alt avantaj al suporturilor neporoase este acela că enzima, rămânând atașată doar în exterior, ea vine imediat în contact cu mediul de reacție.

Efectul difuziei fiind minim, substratul din mediul de reacție poate reacționa fără dificultăți, cu condiția ca acesta să fie solubil în mediul respectiv.

b) Suporturile poroase organice și anorganice sunt în general accesibile pe piață (sticla poroasă, alumină poroasă, oxid de titan poros, polistiren macroreticulat etc.) sub formă de preparate comerciale. Termenul de „pori controlați” se referă la o distribuție limitată a porilor. Mai frecvent utilizate sunt suporturile cu o largă distribuție a porilor (alumină poroasă).

Dezavantajul major al suporturilor poroase constă în faptul că cea mai mare parte a suprafeței capabilă de a lega enzima este plasată în interiorul materialului, moleculele de enzimă legându-se de suprafața internă a porilor. În acest caz un substrat cu dimensiuni mai mari decât ale enzimei nu va penetra decât porii cei mai mari, cea mai mare parte din enzima imobilizată rămânând neutilizată.

Alt factor se referă la structura internă a porilor. Astfel, dacă porul are o încărcare (sarcină) negativă înaltă pe suprafața sa, un substrat având și el undeva o sarcină negativă va fi respins și nu va intra în contact cu enzima, sau punctele sale de contact cu enzima vor fi foarte slabe. În acest caz viteza de reacție va fi mult mai mică decât în cazul enzimei libere sau chiar se va apropia de zero.

În cazul în care suportul are o largă distribuție a porilor, dintre care numai un număr limitat de pori pot fi atât de

largi încât să se acomodeze și cu enzima și cu substratul, numai un număr redus de pori din suprafața totală va fi utilizat.

Avantajele materialelor poroase sunt în principal:

- o arie mare a suprafeței disponibilă pentru imobilizare;
- o legare a enzimei de suprafața internă a porilor, care o protejează de efectele externe de turbulență;
- o sarcină a suprafeței porilor contrară celei a substratului poate ușura accesul substratului la centrul activ al enzimei prin efecte de interacție electrostatică.

c) Suporturi cu structură de gel se utilizează nu numai pentru adsorbția enzimelor, dar și pentru legarea lor covalentă, pentru reticularea sau encapsularea acestora. Asemenea suporturi sunt collagenul și poliacrilamidele.

Aceste geluri n-au pori stabili, fiind dificil a se măsura dimensiunile porilor. În general, aceste suporturi prezintă o suprafață relativ mare disponibilă pentru adsorbție.

În ceea ce privește plasticitatea, suporturile pot fi: rigide (cele anorganice) și flexibile (cele organice).

O structură poroasă rigidă prezintă avantajul că oferă o protecție mai mare față de fenomenul extern de turbulență. Structura agregatului obținut prin imobilizare este stabilă prin lipsa de deformabilitate a suportului însuși.

Suportul elastic (flexibil) are avantajul că se poate utiliza sub formă de membrane fine, care oferă o suprafață optimă mai mare pentru legarea enzimei și deci și pentru reacție, fenomenele de difuzie fiind foarte slabe.

Un efect defavorabil al suporturilor elastice este însă posibilitatea de deformare a structurii terțiare a enzimei, după imobilizare.

3. Mecanismul adsorbției este dificil de elucidat, între proteină și adsorbant formându-se legături de hidrogen, van der Waals, interacții hidrofobe, legături ionice etc.

O influență majoră asupra cantității de enzimă adsorbită pe un suport solid o are concentrația enzimei raportată la unitatea de suprafață a suportului în cursul procesului de imobilizare. Activitatea crește cu creșterea concentrației enzimei apropiindu-se asimptotic de valoarea de saturație la concentrații mai mari de enzimă.

Alți parametri importanți sunt timpul și temperatura, în special pentru suporturile poroase, difuzia fiind un factor important pentru fixarea enzimelor pe asemenea suporturi.

Dezavantajul major al metodei fizice este acela că, chiar și atunci când forțele de legătură dintre enzimă și suport sunt mai puternice, enzima adsorbită se poate desorbi frecvent în cursul utilizării, datorită modificării condițiilor experimentale (temperatură, pH, tărie ionică, natura solventului). De aceea, preparatele obținute nu pot fi utilizate decât un timp scurt.

Formarea de legături inversibile s-a observat pentru urează imobilizată pe caolin sau pentru lactat-dehidrogenază pe colodiu. Legarea inversibilă, care se utilizează în procese enzimatice continue prezintă interes practic dacă enzima rămâne suficient de activă după adsorbție.

Un exemplu de adsorbție pe suport este imobilizarea invertazei pe cărbune activ.

Invertaza (β -D-fructofuranozidofructohidrolaza) catalizează scindarea hidrolitică a zaharozei în glucoză și fructoză (invertirea zahărului), ceea ce are ca rezultat modificarea valorii și semnului rotației optice a soluției apoase de zaharoză.

Adăugată la produsele zaharoase și la siropuri invertaza

împiedică cristalizarea în timp a zahărului, ceea ce reprezintă o aplicare pe scară largă în industria alimentară. Adsorbția pe cărbune activ a invertazei are loc într-o soluție tampon acetat 0,2 M (pH = 4,5), prin centrifugare, timp de 10 minute. Aductul cărbune-invertază se spală de câteva ori cu soluția tampon pentru îndepărtarea enzimei neadsorbite. Enzima imobilizată se păstrează în soluție tampon sau în apă distilată, la maximum 4°C.

I.1.1.1. Factorii care influențează stabilitatea preparatelor de enzime adsorbite pe suport

1. Concentrația ionilor de hidrogen (pH)

Adsorbția enzimei poate fi influențată de variația pH-ului care poate modifica sarcina suportului și/sau a proteinei (enzimei).

În general, maximul de adsorbție este atins la punctul izoelectric al proteinei, cu o variație de $\pm$ 1-2 unități de pH.

2. Prezența sărurilor

Influența sărurilor asupra adsorbției este variată și complexă. S-a stabilit că sărurile împiedică adsorbția și acest fenomen este utilizat pentru eluarea enzimelor adsorbite, cu soluții de săruri. Se cunosc în literatură și unele cazuri în care sărurile favorizează adsorbția enzimelor pe unele suporturi care altfel ar fi inerte față de proteine.

3. Concentrația proteinelor

În general, adsorbția enzimelor crește cu creșterea concentrației proteinelor, până la un nivel de saturare, după care se observă o reducere a activității enzimatice a aductului.

4. Temperatura

Substanțele cu masă moleculară joasă prezintă în general o descreștere a adsorbției cu creșterea temperaturii; la proteine (enzime) efectul este contrar, observându-se o creștere a adsorbției. Acest efect este un indiciu că adsorbția macromoleculei enzimei pe suprafață este un fenomen endoterm. Există și excepții.

5. Viteza adsorbției

Timpul necesar pentru adsorbția proteinelor este considerabil mai mare decât pentru adsorbția substanțelor cu masă moleculară mică. Această viteză mică de adsorbție este atribuită vitezei mici de difuzie a macromoleculelor de proteină.

6. Natura suportului

Suportul influențează gradul de adsorbție și activitatea agregatului enzimatic rezultat, prin: suprafață, porozitate (dacă există) și tratamentele posibile de condiționare.

Pentru suporturi neporoase, adsorbția enzimei este determinată de suprafața totală a materialului.

Dacă suportul este poros, adsorbția nu este influențată întotdeauna numai de suprafața totală. De exemplu, cantitatea de papaină reținută pe sticlă poroasă este funcție atât de suprafața porilor, cât și de suprafața totală a sticlei (Tabelul nr. 2).

În general, afinitatea suprafeței pentru fixarea enzimelor poate fi limitată de dimensiunile moleculei enzimei și de dimensiunea restrictivă a porilor.

Uneori este necesară o condiționare a suportului înainte de imobilizare. Astfel, dacă o enzimă este sensibilă în mediu acid ($\text{pH} \sim 4$), imobilizarea sa pe pori de silice cu dimensiuni controlate poate duce la denaturare, din cauză că suprafața

Tabelul Nr. 2

Relația între mărimea porilor suportului și cantitatea de enzimă adsorbită

Sticlă comercială tip	Diametrul porilor (Å)	Enzime (G.M.)	Suprafața sticlei (m ² /g)	mg Echivalent de enzimă legată / g de sticlă
7740 (tub de sticlă)	neporos	Papaină (21.000)	foarte mică	0
7740P (frită)	50,00	Papaină (21.000)	0,2	0,01
740B (perle)	900	Papaină	20	0,33

porilor este mai acidă. Denaturarea poate fi prevenită tratând materialul poros cu un tampon înainte de imobilizare.

Avantajele metodei de imobilizare prin adsorbție sunt:

- simplitatea;
- posibilități largi în alegerea suporturilor;
- posibilitatea de a realiza simultan purificarea și imobilizarea enzimei;
- posibilitatea de reactivare a conjugatului enzimatic;
- regenerarea suporturilor.

Reactivarea unui agregat enzimă-adsorbant (Tosa, 1969) sub formă de coloană se poate face prin spălarea coloanei cu soluție de enzimă, mai activă.

Regenerarea suportului are ca scop îndepărtarea enzimei dezactivate. De exemplu, o silice poroasă se poate regenera prin

încălzirea cojugatului enzimatic, sau prin eluarea enzimei adsorbite cu o bază tare.

Astfel, regenerarea și reactivarea unei coloane de aminoacilază - DEAE - Sephadex a fost realizată prin spălarea succesivă cu: soluție de NaOH, soluție tampon și soluție de aminoacilază.

Dezavantajul principal al metodei este riscul de desorbție, care duce la scăderea vitezei de reacție, sau la stoparea ei, ca și la contaminarea produsului de reacție.

De aceea, înainte de efectuarea unei reacții enzimatice cu enzimă adsorbită pe suport trebuie stabilite cu acuratețe pentru fiecare enzimă în parte, condițiile corecte de pH, tărie ionică, temperatură, timp, în corelație cu gradul de adsorbție și cu activitatea agregatului enzimatic față de reacția respectivă.

I.1.1.2. Proprietățile enzimelor adsorbite pe suport

Imobilizarea prin adsorbție fiind o metodă fizică, nu duce la modificarea permanentă a unor proprietăți chimice sau fizice ale enzimelor.

În schimb la adsorbant au loc modificări considerabile datorită proprietăților intrinsece ale enzimelor (conformație, sarcină electrică) sau datorită efectelor de micro-vecinătate legate de sarcinile suportului sau de fenomenele de difuzie.

Activitatea remanentă a enzimelor adsorbite în comparație cu cea a aceluiași enzime libere poate varia de la zero (inactivitate totală) la valori apropiate de cele ale enzimei solubile. De exemplu, activitatea remanentă a unor enzime adsorbite pe suport este de: - 50% pentru gluco-6-fosfat-dehidrogenază/coloidiu;

- 1,2% pentru invertază/bentonită;

- 70% pentru α -chimotripsină/caolin etc.

Capacitatea de legare a adsorbanților utilizați pentru imobilizare poate varia de la μg la mg / g de suport.

Influența pH-ului asupra activității enzimelor imobilizate

Efectul pH-ului asupra conjugatelor de enzime imobilizate prin adsorbție este analog cu cel al enzimei imobilizate prin legare covalentă pe suporturi insolubile în apă.

Maximul activității optime a conjugatelor în funcție de pH în comparație cu cel al enzimei libere (solubile) poate fi deplasat la pH mai alcalin sau mai acid, sau poate rămâne nemodificat.

Deplasările pot fi atribuite efectelor de micro-vecinătate create de sarcinile electrice de pe suprafața adsorbantului.

De exemplu: - Deplasări spre pH mai alcalin se observă la:

-chimotripsină/ caolin, gluco-amilază/argilă acidă etc.

- Deplasări spre pH mai acid se observă la:

glucoamilază/DEAE -Sephadex A-25, ATP-dezaminază/
DEAE-celuloză etc.

Constanta Michaelis

Valoarea constantei aparente Michaelis pentru o enzimă adsorbită poate fi mai mare, mai mică sau identică cu cea a enzimei solubile (libere).

Pentru una și aceeași enzimă, diferențele observate pot fi atribuite adsorbanților.

Specificitatea enzimei imobilizate

Unele suporturi au efect inhibitor specific asupra enzimei imobilizate. Astfel, glucoamilaza/acetat mercuric prezintă un grad mare de inhibare față de enzima liberă.

Stabilitatea termică a enzimelor adsorbite

Stabilitatea termică a enzimei imobilizate poate crește, descrește sau rămâne relativ neschimbată față de cea a enzimei libere, spectrul observat fiind foarte larg.

Același lucru se poate spune despre stabilitatea la stocare.

I.1.1.3. Metoda legării ionice

Ca și adsorbția prin legături van der Waals legarea enzimei de suport prin legături ionice este una dintre primele metode de imobilizare cunoscute și comportă un procedeu simplu de obținere a preparatelor insolubile de enzimă imobilizată.

Metoda se bazează pe formarea de legături ionice între proteină (enzimă) și un suport format din rășini schimbătoare de ioni.

Practic, atât legăturile ionice cât și cele van der Waals se formează concomitent, cu deosebirea că primele sunt mai puternice decât cele formate în adsorbția propriu-zisă.

Ca și adsorbția clasică legarea ionică de suport folosește aceleași procedee. Legarea ionică a enzimei de suport depinde de asemenea de pH și de tăria ionică. Se obțin preparate de enzime imobilizate cu o activitate remanentă înaltă.

Prima imobilizare prin legături ionice a fost făcută de către Mitz în 1956, când s-a fixat catalaza pe DEAE-celuloză, iar în 1969 s-a semnalat prima utilizare industrială a L-amino-acilazei fixată prin legături ionice pe schimbători de ioni.

De obicei se utilizează suporturi organice cu grupări schimbătoare de ioni, dar se pot folosi și suporturi anorganice cu structură de ani-oniți sau cationiți (silice modificată).

Polimerii organici cei mai folosiți sunt: derivați ai polizaharidelor (mai ales celuloză și dextran) ca și polimerii stirenici sintetici.

Aceste suporturi pot fi clasificate în: schimbători de anioni (bazate pe proprietatea de a schimba anionii Cl^- , OH^- etc. a suportului cu anionii din soluție - resturile anionice ale enzimei -) și schimbători de cationi (H^+ , Na^+ etc. se schimbă cu cationii din soluție - resturile cationice ale enzimei -).

Asemenea substanțe utilizate ca suporturi sunt compușii ce conțin grupări: amino, guanidino, amine terțiare, din care se prepară schimbătorii de cationi: DEAE, TEAE, ECTEOLA etc. și compuși conținând grupări: sulfat, fosfat și carboxilat - schimbători de anioni (Tabelul Nr. 3).

Tabelul Nr. 3

Exemple de suporturi - schimbători de ioni

Schimbători de anioni	Schimbători de cationi
DEAE-celuloză	CM-celuloză
AE-celuloză	Celuloză-fosfat
TEAE-celuloză	CM-Sephadex
DEAE-Sephadex	SP-Sephadex
DEAE-Bio-Gel A	Dextran-sulfat
Amberlit ^R IRA 93	Amberlit ^R IRC 50
Amberlit ^R IRA 94	Amberlit ^R IRC 200
Amberlit ^R IRA 910	
Amberlit ^R IRA 938	

Un exemplu de imobilizare pe rășină schimbătoare de ioni este catalaza care are un punct izoelectric relativ ridicat ($pH_1 = 7$) și se poate lega cu succes de un schimbător de ioni anionic ca de exemplu carboximetil-celuloza (CMC).

Legarea se face într-o soluție tampon de citrat-fosfat cu $pH=4,5$, prin agitare la $25^{\circ}C$, timp de 60 minute. Aductul separat prin centrifugare se spală cu soluție tampon diluată și apoi cu apă distilată.

Se observă că soluțiile tampon cu $pH=4,5$ (care accentuează sarcina electrică pozitivă a moleculei de enzimă) sunt mai favorabile cuplării cu suprafața CMC decât soluțiile tampon neutre (de NaCl); aducții obținuți în cel din urmă caz prezintă o activitate mult mai mică în reacția de descompunere a apei oxigenate.

În tabelul Nr. 4 sunt date și alte exemple de biocatalizatori imobilizați pe schimbători de ioni.

Tabelul Nr. 4

Exemple de enzime imobilizate pe schimbători de ioni

Enzima	Suport	Autori
Catalază	DEAE-celuloză	Mitz (1956)
Aminoacilază	DEAE-celuloză	Tosa și colab., 1967
Aminoacilază	DEAE-Sephadex	Tosa și colab., 1969
Aldehidoxidază	Octilamino-Sepharoza 4B	Angelino și colab., 1985
Lactat-dehidrogenază	Octilamino-Sephadex	Hofstee (1973)
Invertază	DEAE-celuloză	Suzuki și colab., 1966
Invertază	Amberlite IRA	Boudrant și Ceheftel, 1975
Glucozooxidaza	DEAE-Sephadex, DEAE-celuloză	Kuhn și colab., 1980
Dextranucrază	DEAE-Sephadex	Ogino (1970)

I.1.1.4. Imobilizare prin complexare cu metale

Emery, Barker și alții au dezvoltat primii o tehnică de legare a enzimelor de un suport prin intermediul complexării cu metale tranziționale.

Ca suporturi se folosesc: celuloză, nylon, sticlă borosilicioasă, perle de sticlă sodică, hârtie de filtru etc. (cu grupări donoare de electroni).

Pentru formarea legăturii dintre suport și enzimă se utilizează și : $TiCl_4$, $TiCl_3$, $SnCl_4$, $SnCl_2$, $ZnCl_2$, VCl_3 , $FeCl_2$ și $FeCl_3$ (acceptori de electroni).

Metoda de activare a suportului cu săruri ale unor metale tranziționale se bazează pe proprietatea metalelor tranziționale de a forma chelați ce pot fi folosiți la cuplarea enzimelor.

Activarea suportului se face introducând suportul solid într-o soluție a sării metalice timp de 5-10 minute. Complexul format se filtrează și/sau se usucă la $45^{\circ}C$.

Solidul uscat este apoi spălat cu un tampon pentru îndepărtarea excesului de sare nereacționată.

Enzima se imobilizează prin agitarea suportului activat într-o soluție tamponată de enzimă. Produsul este apoi spălat pentru îndepărtarea enzimei nelegate. În fig. nr.2 este dat exemplul $TiCl_4$ care poate complexa astfel cu celuloza în mediu apos.

Deci în soluții de $TiCl_4$, ioni de Ti^{IV} formează legături coordinative cu molecule sau specii ionice (liganți) conducând la complecși de tip donator-acceptor de forma:

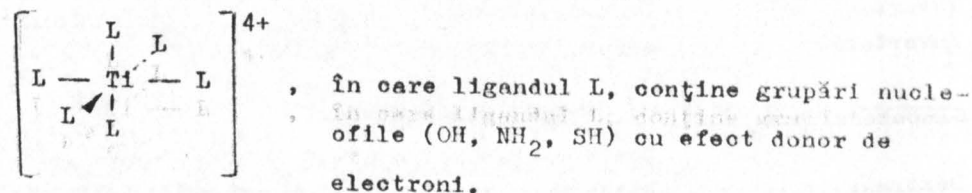
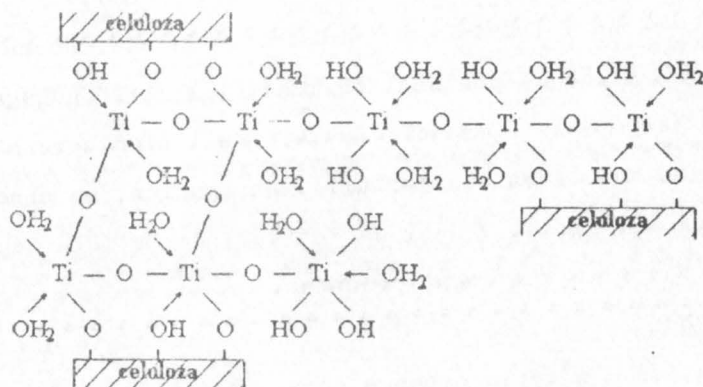


Fig. Nr. 2



În acest fel, ionul central complexează atât cu suportul cât și cu enzima.

Enzimele conțin grupări care pot funcționa ca liganzi (COOH terminale din acidul aspartic, -OH fenolice din resturile de tirosină, -OH alcoolice din resturi de serină și treonină, -SH din cisteină, -NH₂ terminale și din resturi de lizină etc.).

Prin acest procedeu se obțin agregate active suport-enzimă, a căror preparare depinde de:

- disponibilitatea unor grupări terminale din enzima-ligand;
- factorii sterici care influențează contactul acestor grupări cu atomul central de Ti;
- inexistența acestor grupări în regiunea centrilor activi ai enzimei;
- densitatea moleculelor de enzimă deja legate de suportul polimer.

Acest procedeu este simplu și rapid și se pretează la apli-

cații industriale.

Surprinzător este faptul că dacă se regenerează suportul și se supune unei noi activări cu un strat nou de sare metalică și apoi se recuplează cu enzima, se observă o activitate dublată față de preparatul inițial cu enzima imobilizată. Aceasta se explică prin aceea că procesul de reactivare prin adăugarea unui nou strat pe suprafață reduce efectele de împiedicare sterică.

În ceea ce privește suporturile anorganice, se observă că silicagelul este relativ ușor de activat, dar stiola neporoasă nu se poate activa prin acest procedeu.

O metodă asemănătoare de imobilizare folosește oxizi metalici hidratați. Se obțin produse comerciale accesibile și destul de stabile. Imobilizarea are loc într-o singură etapă, oxidul metalic hidratat fiind unicul suport pentru imobilizarea enzimei. Asemenea oxizi se obțin prin purificarea produșilor de hidroliză ai clorurilor metalice respective; urmează legarea enzimei prin chelatizare. Această metodă conduce la o activitate enzimatică reziduală de 30-80%.

Stabilitatea preparatelor obținute prin complexare cu metale este variabilă, ea scăzând în cazul suporturilor cu masă moleculară înaltă (amidon).

Metalul activator (Ti) pare că influențează stabilitatea acestor preparate de enzime imobilizate, probabil prin efectul de inhibiție pe care-l are metalul față de enzimă.

Procedeu de imobilizării prin formare de legături metalice oferă o posibilitate în plus de lucru, dar este o tehnică mai puțin economică și mai puțin simplă (accesibilă) decât cea a adsorbției directe.

I.1.2. Includerea în geluri insolubile în apă

Metodele de includere se bazează în general fie pe introducerea enzimelor în rețeaua tridimensională a unui polimer, fie pe înglobarea acestora în membrane semipermeabile, astfel încât să fie prevenită desprinderea proteinei în timpul reacției și în același timp să se permită difuzia substratului și a produsului de reacție enzimatică.

Metoda diferă de metodele chimice de cuplare prin aceea că enzima nu este legată covalent de gel sau de membrană, ci este reținută fizic.

Conformația tridimensională a enzimei are un efect important asupra acțiunii sale catalitice, ceea ce impune alegerea unei asemenea metode de imobilizare, încât structura sa (primară, secundară, terțiară) să nu fie afectată.

Includerea fizică a enzimei în particulele de gel este o imobilizare în care nu are loc nici o modificare a resturilor de aminoacizi din secvența proteinei și care oferă în plus avantajul unor condiții blânde de fixare; nu au loc modificări semnificative ale enzimei. Prezența unor agenți protectori (de exemplu antioxidanți) sau stabilizatori în cursul polimerizării nu afectează randamentul includerii enzimei în rețeaua polimerului obținut.

Metoda poate fi aplicată la enzime purificate ca și la alte materiale enzimatice ca: extracte celulare brute, organite celulare sau chiar la culturi de microorganisme

În particular, procesul fizic constă în pătrunderea enzimei (sau a materialului ce trebuie inclus) în spațiile interstițiale ale unor macromolecule tridimensionale de polimeri insolubili în apă.

Primele incluziuni au fost făcute în 1963, de către Bernfeld și Wan. Ei au inclus enzime ca: tripsina, chimotripsina, papaina, α -amilaza etc. în geluri de poliacrilamidă (PAA) reticulată. Se pot folosi geluri naturale (polizaharide, gelatină, alginat etc.) dar și rășini epoxidice, poliuretani, ca și copolimeri vinilici și acrilici.

În tabelul Nr.5 sunt date exemple de geluri de incluziune folosite frecvent, ca și de metode de includere aplicate de la caz la caz.

Tabelul Nr. 5

Metode de includere în geluri organice a biocatalizatorilor

Principiul insolubilizării	Gelul	Materiale ce se pot include
Gelificare termică	Agar, gelatină, carrageenan, colagen	Celule vii și organe celulare
Gelificare ionotropă	Alginat, carrageenan, chitosan	Celule vii și organe celulare
Precipitare prin modificarea solventului	Triacetat de celuloză, diacetat de celuloză	Enzime, celule vii și celule moarte
	Polistiren	Enzime și celule moarte
Policondensare	Rășini epoxidice, poliuretani	Enzime și celule moarte
Polimerizare	Polimeri și copolimeri (met)acrilici și vinilici	Enzime și celule moarte

După cum se poate observa din tabelul Nr. 5 gelurile folosite pentru includerea enzimelor necesită trei tipuri majore de operații pentru imobilizarea lor și anume:

- 1) Precipitare prin modificarea solventului. (pentru suporturi ca: acetați de celuloză și polistiren) bazată pe schimbarea solventului prin transferul amestecului polimer-enzimă dintr-o fază organică într-o fază apoasă.
- 2) Policondensarea precursorilor de policondensare, care are loc „in situ”, în prezența enzimelor ce se includ în rețelele tridimensionale ale gelului macromolecular rezultat (pentru rășini epoxidice și poliuretani).
- 3) Polimerizarea „in situ” plecând de la precursorii (monomerii) respectivi, concomitent cu includerea enzimelor în gelurile rezultate [pentru (co)polimeri (met)acrilici și vinilici].

I.1.2.1. Materiale și metode utilizate pentru includerea enzimelor în geluri

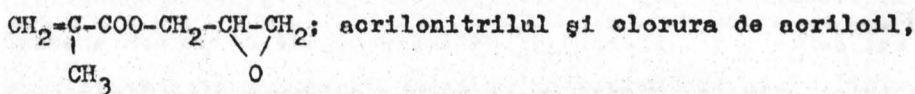
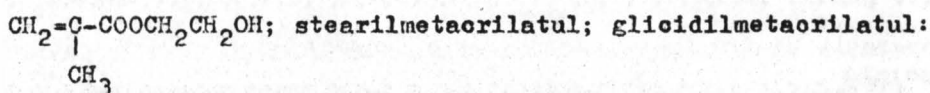
1.º Polimeri și copolimeri acrilici

Principiul general al metodei de includere constă în amestecarea precursorilor (monomerilor) cu un agent de reticulare și cu enzima dizolvată (dispersată) într-o soluție tampon, după care se adaugă un inițiator de polimerizare.

Multe enzime pot fi incluse astfel în polimeri acrilici; variind monomerul utilizat se modifică proprietățile fizice și chimice ale (co)polimerului-suport. Pe baza acestor suporturi se pot obține preparate de incluziune cu o bună stabilitate mecanică, chimică, termică și inerte la acțiuni microbiene.

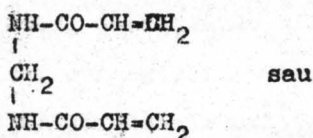
Precursori de (co)polimerizare pot fi monomeri ca:

acrilamida; acidul acrilic; acidul metacrilic; metil-metacrilatul (LMA); metilacrilatul; 2-hidroxietil-metilacrilatul (HEMA):

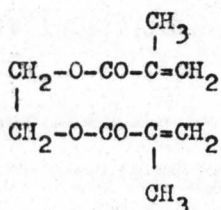


2-hidroxietilacrilatul (HEA): $\text{CH}_2=\text{CH}-\text{COO}-\text{CH}_2-\text{CH}_2\text{OH}$ etc.

Ca agenți de reticulare se utilizează monomeri bifuncționali ca: N.N'-metilen-bisacrilamida (BIS):



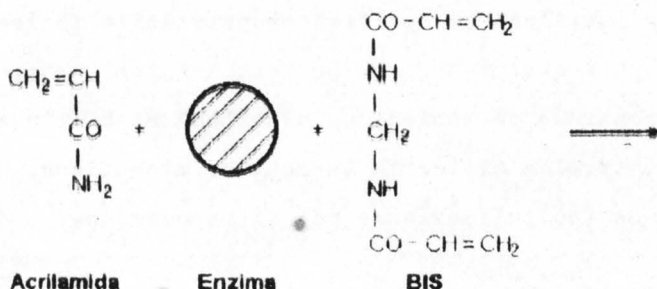
etilenglicol-dimetacrilatul (EGDMA):

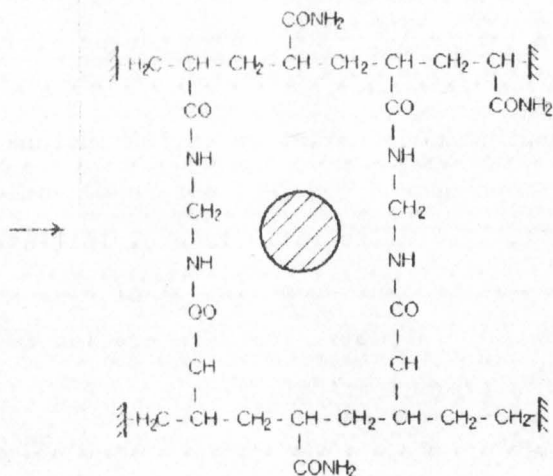


De exemplu structura unui gel de poliacrilamidă reticulat cu BIS, având enzima inclusă în rețeaua tridimensională a copolimerului va fi următoarea (fig.nr.3):

Fig. nr. 3

Structura unui aduct enzimă-gel de poliacrilamidă reticulat cu BIS

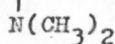




Polimerizarea radicalică a acrilamidei se efectuează cu soluții apoase ce conțin enzima solubilă (liberă) și agentul de reticulare (BIS).

(Co)polimerizarea radicalică în mediu apos a monomerilor acrilici are loc la temperaturi joase (1-5°C) pentru a se preveni degradarea termică a enzimei și în absența oxigenului (în atmosferă de azot), deoarece O₂ este inhibitor de polimerizare.

Ca inițiator de polimerizare se utilizează persulfatul de potasiu (K₂S₂O₈) sau riboflavina, iar drept catalizator β-dimetilamino-propionitril (DMAPN): CH₂-CH₂-CN sau N,N,N',N'-tetrametil-



etilendiamina (TEMED): (CH₃)₂N-CH₂-CH₂-N(CH₃)₂

Rezultă un gel sub formă de bloc, care se dispersează mecanic (prin mărunțire) în particule de dimensiuni diferite, care se pot sorta prin cernere pe site cu ochiuri de diverse mărimi.

Această metodă a polimerizării în bloc are dezavantajul obținerii unor particule cu aspect neregulat, fragile și care pot pierde enzima la suprafața de ruptură.

Aceste dezavantaje dispar dacă se utilizează metoda de

polimerizare în picături („perle”), ceea ce duce la o înzestrare a rezistenței mecanice a particulelor, îndepărtându-se și riscul desprinderii enzimei de pe suport.

Pentru obținerea unui polimer perlat cu enzimă inclusă, se dispersează o soluție tampon apoasă (pH=7-8) conținând enzima, stabilizatorul, monomerii, agentul de reticulare și inițiatorii, într-un mediu hidrofob (care conține un emulgator și are aceeași densitate ca și faza apoasă). Polimerizarea care are loc imediat decurge de asemenea în atmosferă inertă (N_2).

În laborator, operația se efectuează într-un balon cu patru găuri, prevăzut cu: agitator mecanic, termometru (cufundat în masa de reacție) și două tuburi (prin care intră și se evacuează din masa de reacție curentul de azot), răcirea făcându-se cu o baie de gheață.

În instalațiile industriale se utilizează coloane pentru prepararea unor agregate în cantități mari, în flux continuu.

Preparatul de enzimă inclusă în polimer trebuie spălat cu atenție pentru a se îndepărta monomerii nereacționați, inițiatorii etc., fără însă a se îndepărta și enzima inclusă. Purificarea avansată a preparatului este deosebit de importantă, mai ales când acesta este folosit în medicină și industria alimentară deoarece monomerii vinilici sunt cancerigeni. Salinitatea ridicată ca și unii solvenți organici (toluen) pot determina desprinderea enzimei din preparat.

Factorii care influențează randamentul
incluserii și activitatea remanentă a
enzimelor incluse

Cantitatea de enzimă inclusă se determină prin analiza aminoacizilor conținuți de aceasta (hidroliză acidă).

Pentru dozarea suportului se poate utiliza metoda scintigrafică, aplicată după solubilizarea polimerului acrilic în H_2O_2 30% la $60^{\circ}C$ sau în toluen la $65^{\circ}C$.

Randamentul în enzimă inclusă depinde de cel puțin trei factori esențiali:

- solubilitatea enzimei în amestecul de reacție care conține monomerul;

- masa moleculară a enzimei și

- cantitatea de monomer

Includerea enzimei într-un gel este ușurată de solubilitatea sa în soluția de monomeri. Totuși s-a observat că microorganismele suspendate în soluții de monomeri se includ rapid, că enzimele respective nu se desprind de suport și că din amestecul uscat de enzimă-polimer, ~ 30% în greutate este constituit din materialul inclus, atât în polimerizarea în bloc cât și în perle.

Se pare că există și o corelare pozitivă între masa moleculară și randamentul incluserii.

De asemenea, cantitatea de enzimă inclusă crește cu concentrația totală a monomerului.

Structura și porozitatea gelului omogen obținut final depind de:

A - Masa totală de monomeri per 100 ml soluție

S-a găsit că pentru polimerii (copolimerii) vinilici, activitatea remanentă optimă a enzimei corespunde unui procentaj de

15% monomeri.

B - Cantitatea de agent de reticulare exprimată în procente de masă, față de cantitatea totală de monomer. Din acest punct de vedere polimerii reticulați se caracterizează printr-un punct de tranziție corespunzător unui minim de dimensiune medie a porilor în funcție de cantitatea de agent de reticulare / cantitatea totală de monomer.

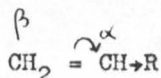
Pentru polimerii (copolimerii) acrilici acest punct de tranziție corespunde valorii de 5%. Deasupra acestui punct, polimerul își schimbă organizarea internă a gelului (devine opac), căpătând o distribuție neregulată a mărimii porilor.

C - Condițiile de polimerizare

În 1970, Mosbach a combinat tehnica includerii fizice cu o legare covalentă simultană a enzimei de polimer. Acest lucru s-a realizat în prezența unei carbodiimide solubile în apă, prezentă în soluția monomerului, care leagă covalent grupele NH_2 ale enzimei de grupele COOH ale polimerului.

În acest fel enzima nu este numai inclusă, dar și legată chimic de polimer.

De asemenea s-a observat că și în timpul reticulării poliacrilamidei cu BIS se formează legături covalente directe între unele enzime și poliacrilamidă. Acest fenomen poate avea loc în cazul în care proteina conține grupe- NH_2 sau-SH libere care pot forma legături covalente cu atomul de C din poziția β a monomerului acrilic:



Ingredientele din mediul de reacție pot provoca în cursul polimerizării denaturarea proteinei. De aceea trebuie aleasă cu grijă atât natura cât și concentrația ingredientelor folosite

(de exemplu, ureea determină denaturarea proteinelor).

Uneori, la începutul polimerizării, se observă o scădere drastică a activității proteinei; această denaturare este însă reversibilă, activitatea enzimei refăcându-se la sfârșitul polimerizării. Pentru a evita scăderea activității enzimei, agreatul obținut trebuie spălat bine până la îndepărtarea oricăror urme de monomer.

Denaturarea parțială a enzimei în cursul polimerizării se datorește în parte și radicalilor liberi formați intermediar, dar cum concentrația acestor radicali rămâne foarte joasă, efectul lor nu este semnificativ.

Polimerizarea mai poate fi indusă și radiochimic (γ); totuși randamentele obținute rămân inferioare polimerizării catalizate chimic (la care sunt de 30-100%).

Unele geluri sintetice ca poli-N-alchil-acrilamidele reticulate prezintă proprietăți termice reversibile: în soluții apoase se comprimă în jurul unei temperaturi critice (Lower Critical Solution Temperature - LCST); sub această temperatură gelurile se dilată. Asemenea geluri pot fi folosite pentru recuperarea și reciclarea biocatalizatorilor, prin încălzirea aducțiilor gel-enzimă peste LCST. În asemenea geluri pot fi incluse cu succes asparaginaza și β -galactozidaza.

Astfel, β -galactozidaza s-a inclus simultan cu copolimerizarea în suspensie a N-izopropilacrilamidei (90%) și acrilamidei (10%) în prezența BIS, în parafină. Gelul obținut are LCST = 37-40°C.

Un dezavantaj al acestor aducții este îngreunarea transferului de masă al substratului și al produsului de reacție, datorită comportamentului termic al gelului, mai ales că activitatea β -galactozidazei astfel inclusă este maximă la 35-40°C.

2° Gelul de amidon

În 1963, Vesta și Udin au utilizat amidonul pentru imobilizarea colinesterazei.

Se poate folosi și o metodă combinată. Astfel, în 1965, Baumann și colab. au inclus colinesteraza într-o spumă de poliuretan, folosind o soluție apoasă caldă de enzimă și amidon, obținându-se agregate sub formă de blocuri.

Se mai poate folosi amestecul de amidon și poliacrilamidă; rezultă un suport cu structură spongioasă și o rezistență mecanică crescută, datorită poliacrilamidei. Pentru a se evita desprinderea biocatalizatorului din gelul reticulat, moleculele enzimei pot fi supuse unei pre-reticulări cu glutaraldehidă înainte de includerea propriu-zisă, ceea ce mărește activitatea remanentă a enzimei.

3° Cauciucul siliconic

Cauciucul siliconic este un suport hidrofob.

Astfel, glucooxidaza se poate include în felul următor: se amestecă enzima cu o rășină (Silastic), cu poli(dimetilsiloxan): $[\text{Si}(\text{CH}_3)_2\text{O}]_n$ și un agent de reticulare (octanat de Sn). Reacția este completă după câteva ore la 5°C. Se include 8% din enzimă, cu o activitate remanentă de 50%

Polimerul fiind hidrofob și inert se poate utiliza la obținerea unor agregate folosite în medicină pentru implantări.

4° Fibrina

Un suport de interes pentru scopuri medicale (de exemplu pentru substituirea carențelor în enzime) este fibrina, o substanță naturală netoxică, care nu produce fenomenul de respingere antigen - anticorp.

Astfel, asparaginaza, utilizată la tratarea leucemiei la copii, se include într-un polimer de fibrină, prin amestecarea

enzimei cu fibrinogen din plasmă și trombină, într-o soluție de trnapon - citrat.

5.º Colagenul

Colagenul este un polimer natural, o proteină care formează partea structurală a unei mari varietăți de celule și membrane. El are un caracter hidrofil mare; datorită naturii sale fibroase, colagenul poate fi transformat ușor în membrane (folii), ce pot fi folosite în bioreactoare.

În comparație cu polimerii sintetici, structura colagenului oferă o micro-vecinătate mai favorabilă pentru enzime. Prin imobilizarea unei enzime în colagen, se formează o rețea între moleculele celor două proteine. În complexul foarte stabil rezultat enzima este legată atât chimic (covalent) cât și prin legături necovalente (van der Waals, ionice, legături de H etc.), cele două tipuri de legături activându-se reciproc.

Se cunosc trei procedee diferite pentru prepararea membranelor de tip colagen-enzimă (fig. nr. 4).

- Acestea sunt:
- a) impregnarea membranelor;
 - b) complexare macromoleculară și
 - c) electrodepuneri

Se folosește de obicei colagen din tendoane de vită (o dispersie 1% în greutate, preparată în amestec metanol:apă în volum, conform metodei Hochstadt și colaboratorii.

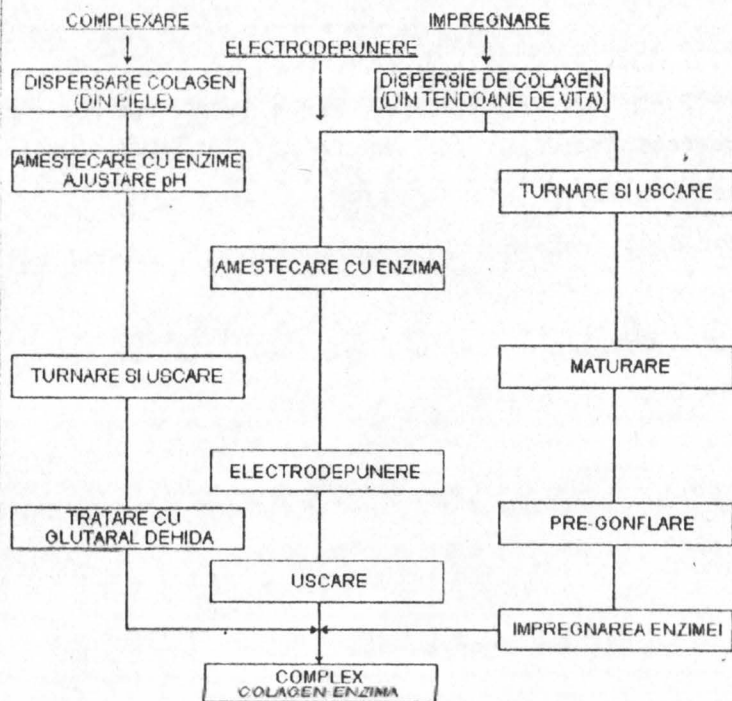
a) Metoda impregnării membranei

În această metodă, enzima se impregnează într-o membrană solidă, preformată. Gradul de impregnare a membranei cu enzimă depinde de pH-ul și temperatura din cursul impregnării. Ambii parametri ușurează difuzia moleculară a enzimei în membrană. Uscarea ulterioară a aductului apropie grupările încărcate

electric ale enzimei de cele ale collagenului, reducând distanța intermoleculară dintre ele.

Fig. nr. 4

Metode de preparare a aducțiilor collagen-enzimă



Modul de lucru este simplu și constă în dispersarea unui gel de collagen ($\sim 30\%$ materie solidă) în apă distilată, după care se corectează pH-ul dispersiei la $\text{pH}=3$, cu acid lactic. După o omogenizare de 1-5 minute la 25°C , amestecul se răcește pe baie de gheață, continuându-se omogenizarea. Dispersia se degazează la presiune redusă, după care se întinde o membrană omogenă, cu grosimea de ~ 6 mm. Membrana se lasă să se usuce la temperatura camerei, după care se taie în bucăți. Particulele

obținute se dispersează într-o soluție tampon, timp de 4 ore, la pH-ul optimal al enzimei ce se imobilizează, după care se introduc în soluția enzimei la același pH. Concentrația enzimei în baia de impregnare este de 10-20 mg/ml. Impregnarea are loc la temperatura camerei sau la temperaturi mai joase în cazul enzimelor termolabile.

Durata impregnării este în general de 24-36 ore, în funcție de enzimă. Membrana impregnată se spală și se lasă să se usuce complet, la temperatura camerei.

b) Complexarea macromoleculară

În acest procedeu, enzima se adaugă direct la o dispersie apoasă de collagen, prin agitare. În dispersie, moleculele de collagen se găsesc în starea lor nativă, microfibrilară, capabile de a interacționa cu enzima, proces facilitat de etapa uscării. Această tehnică reduce numărul de etape la prepararea aducților collagen-enzimă. Dispersii moleculare cu proprietăți bune se obțin în intervale de pH=2,5-4,5 și 10,0-11,5, cu condiția ca enzima să fie solubilă în aceste condiții de pH.

Raportul cantitativ enzimă:collagen se menține la 0,1:0,3 (în greutate). Înainte de a se introduce în dispersia de collagen, enzima se dizolvă în apă distilată.

O variantă a metodei de complexare este utilizarea unui agent de reticulare bifuncțional, care va lega concomitent moleculele fibrilare de collagen și cele de enzimă; metoda se încadrează în clasa procedeelor de fixare covalentă a enzimei pe suport; se folosește ca agent de reticulare glutaraldehida.

c) Metoda electrodepunerii

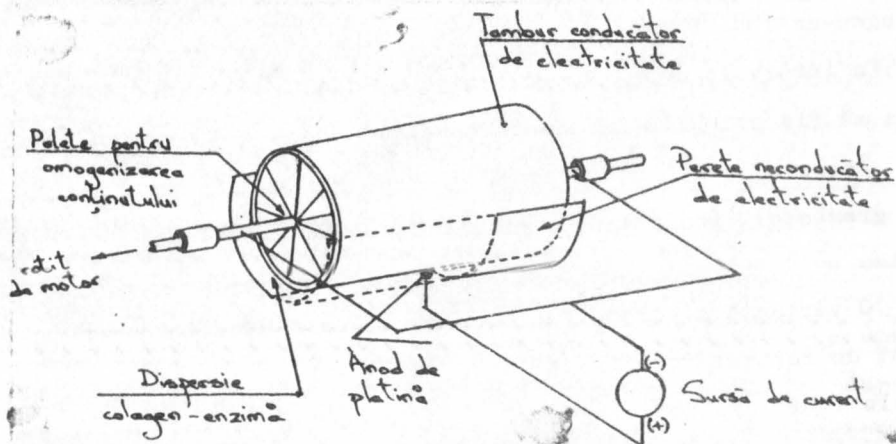
Această metodă este bazată pe fenomenul electroforezei, al migrării polielectroliților amfoteri (în acest caz proteine) sub

influența unui curent electric și la valori ale pH-ului diferite de cele ale punctului izoelectric (pH_1).

Adăugând enzima la o dispersie de collagen cele două proteine interacționează la valori corespunzătoare de pH, formând complecși macromoleculari. Acești complecși pot migra către și se pot depune pe suprafața unui electrod, la un anumit potențial electric. Viteza mobilității electroforetice ca și cantitatea de complex depus depind de gradientul voltajului aplicat, aria suprafeței electrozilor, pH și vâscozitatea dispersiei. Ajustând acești parametri, se pot obține membrane de diverse grosimi. Procedul a fost pus la punct de Suzuki și colaboratorii în 1972.

Fig. nr. 5

Aparat pentru electrodepunere



Modul de lucru

Collagenul se prepară sub formă de dispersie în apă deionizată, de concentrație 0,3-0,4% (în greutate). La această dispersie se adaugă soluția de enzimă (2-4 mg/ml) și se ajustează pH-ul la 3,0 cu acid lactic. După amestecarea prin agitare timp de o oră, amestecul se introduce într-un vas de electrodepunere

Lucite (din „sticlă organică”), neconducător de electricitate. Semicilindrul Lucite este utilizat ca vas de depunere. O placă de platină este plasată pe suprafața internă a acestui semicilindru și va servi drept anod. Catodul este format dintr-o placă de oțel. Cei doi electrozi sunt fixați la o distanță de 2 cm pe o tijă neconducătoare legată la motorul electric. Cu o rotație de 10 cicluri pe minut anodul este trecut prin dispersia de collagen-enzimă, în care timp are loc depunerea și uscarea straturilor alternative de enzimă imobilizată. Procesul continuă 25-50 minute, după care membrana se lasă să se usuce la temperatura camerei și se desprinde de pe anod.

Prin același procedeu, enzima imobilizată în collagen se poate depune pe o spirală metalică. În acest caz este utilizat drept anod un vas de oțel inoxidabil și drept catod se folosește o spirală de oțel.

În general, preparatele de tip collagen-enzimă pot avea o activitate biocatalitică remanentă de 25-50%.

6.° Polimeri anorganici

Un suport de silice a fost utilizat pentru prima oară în 1955, la includerea catalazei, ureazei și acid adenilic-dezaminazei. A urmat includerea tripsinei în silicagel.

Pentru aceasta, enzima se adaugă la o soluție de acid silicic, sub agitare și se ajustează tăria ionică la 0,1. Gelul se lasă în condiții normale 30 minute și apoi, la maturare, 12 ore. Hidrogelul format este apoi liofilizat, granulat și spălat pentru îndepărtarea enzimei neincluse. Activitatea remanentă a

tripsinei incluse este de 34%, având acțiune esterolitică dar nu și proteolitică asupra caseinei. Lipsa activității proteolitice se poate datora repulsiei electrostatice (suportul și enzima sunt încărcate negativ la pH=8), împiedicării sterice sau distrugerii activității proteolitică în urma imobilizării.

7° Includerea în geluri folosind precursori oligomeri

Obținerea unui polimer dintr-un oligomer (cu molecule mai mari decât precursorii monomeri) prezintă mai multe avantaje:

- numărul total de molecule din amestecul de reacție este mai mic;
- dimensiunile lor sunt mai mari;
- temperatura de reacție se reduce corespunzător cu gradul de polimerizare a precursorului.

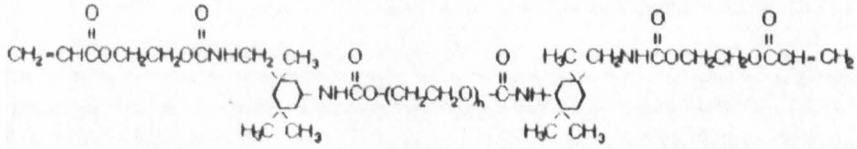
În plus, reacțiile de condensare reclamă prezența unor grăpări funcționale mai reactive (epoxi, carbonil sau izocianat) care pot reacționa și cu moleculele enzimei, conducând la un procedeu mixt de imobilizare concomitentă prin includere și legare covalentă.

În 1978, Fukui și colaboratorii au descoperit o metodă de includere a enzimelor și a celulelor cu ajutorul rășinilor prepolimere fotoreticulabile, cu caracter hidrofil sau hidrofob (fig. nr. 6). În fig. nr. 6 se indică structura unor astfel de oligomeri.

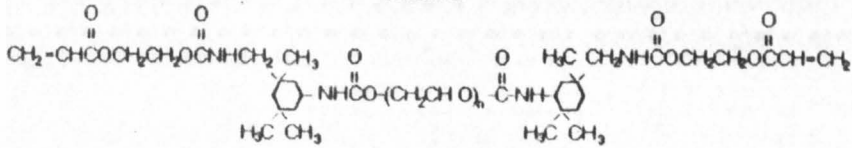
Prin tratarea acestor oligomeri cu o cantitate de 1% de fotosensibilizator (etileterul benzoinei) și iluminare UV la $\lambda = 360$ nm timp de câteva minute, se induce polimerizarea cu formarea unui gel reticulat, tridimensional. Porozitatea gelului este controlată de lungimea lanțului oligomer, iar hidrofilicitatea - de prezența resturilor poliglicolice din oligomer. În acest fel se oferă o largă varietate de suporturi pentru includerea

Figura nr. 6

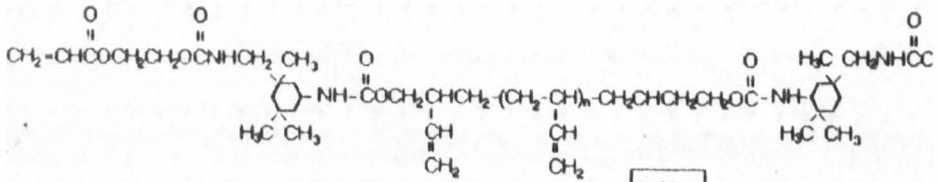
Structura unor oligomeri fotoreticulabili folosiți pentru
includerea enzimelor și celulelor



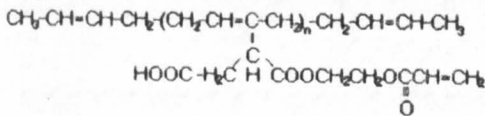
ENT



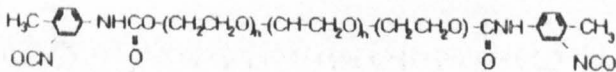
ENTP



ENTB



PBM



PU

Fig. nr. 6 (continuare)

- ENT = derivat hidrosolubil al polietilenglicolului;
ENTP = derivat hidroinsolubil al polipropilenglicolului;
ENTB = derivat hidroinsolubil al polibutadienei;
PBM = copolimer hidroinsolubil butadienă - anhidridă maleică;
PU = poliuretan miscibil cu apa.

enzimelor chiar și în solvenți organici atunci când agregatul obținut urmează a fi folosit la reacții în acești solvenți.

Alt avantaj al metodei constă în buna stabilitate chimică și mecanică a suportului, cărui i se pot da diferite forme (filme, fibre, perle etc.).

Elastomerii poliuretani, având grupe izocianat în compoziție, pot reacționa cu grupe NH_2 sau OH . Astfel, prin rețicularea lor cu apă, poliizocianatii degajă „in situ” CO_2 , care conferă suportului o structură poroasă. Reacția cu apă este foarte puternică, expansiunea spumei se reduce dacă reacția se conduce la presiune ridicată sau dacă gelificarea are loc la temperatură redusă (Klein și Kluge, 1984).

În cazul formării rășinilor epoxi obținute prin reacția epoxi-oligomerilor bifuncționali cu poliamine, condensarea are loc la temperatura camerei, în mediu slab alcalin ($\text{pH} < 9$). În cursul condensării poate avea loc însă și o inactivare ireversibilă a enzimei, aminele fiind în general agenți de denaturare a proteinelor. De aceea enzima nu se adaugă de la început, ci numai înainte de gelificare. Suportul are o foarte mare stabilitate chimică și mecanică. Acest sistem se folosește pentru imobilizarea enzimelor intracelulare din celulele moarte.

8.º Folosirea polimerilor naturali la includerea unor
molecule polimere cu masă mare

Metoda gelificării ionotrope se foloseşte pe cale largă la includerea de celule viabile în geluri de polimeri naturali ca: alginat, chitosan, carrageenan etc. (pag. 26).

Principiul metodei este coacervarea; metoda, utilizând compuşii netoxici a fost folosită în 1977 de Kierstun şi Bubke pentru imobilizarea celulelor viabile şi în 1979, de către Brodelius şi colaboratorii pentru includerea celulelor foarte sensibile (celule de plante, protoplaste).

Includerea constă în amestecarea enzimei cu o soluţie apoasă de polielectrolit; amestecul se picură apoi sub agitare într-o soluţie ce conţine ioni polivalenţi de semn contrar. Rezultă particule sferice, uniforme, cu structură poroasă, care pot reţine celule, organite celulare şi enzime cu molecule mai mari decât porii. Porozitatea gelului depinde de concentraţia polielectrolitilor şi a ionilor polivalenţi. Câteva exemple de polielectroliti şi ioni polivalenţi corespunzători sunt date în tabelul Nr. 6.

Tabelul Nr.6

Polielectroliti şi ioni polivalenţi folosiţi în includerea
prin gelificare ionotropă

Polielectroliti	Ioni polivalenţi
<u>Polianioni</u>	
Alginat de sodiu	Ba ²⁺
Carboximetilceluloza	Ca ²⁺
Copolimer stiren-acid maleic	Fe ²⁺
Copolimer acetat de vinil - acid maleic	Zn ²⁺
Copolimer izobutenă-acid maleic	Co ²⁺

Tabelul Nr. 6 (continuare)

Polielectroliți	Ioni polivalenți
<u>Polianioni</u>	
Copolimer furan-acid maleic	Al^{3+} , Fe^{3+}
<u>Policazioni</u>	
Chitosan	$Fe(CN)_6^{4-}$ $Fe(CN)_6^{3-}$ Polifosfați Acid polialdehido- carbonic

Electrolitul polianionic cel mai utilizat este alginatul de sodiu. Includerea biocatalizatorului are loc la temperatura camerei, excluzându-se deactivarea termică a enzimei.

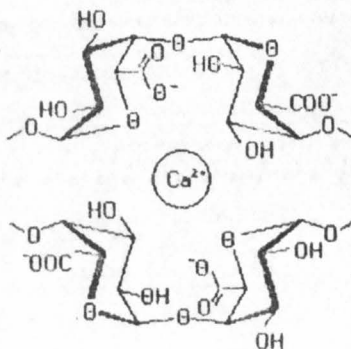
Clorura de calciu este cel mai uzual furnizor de cationi; alginatul de sodiu, inițial solubil în apă, se gelifică în soluția de $CaCl_2$, când are loc o reacție de schimb a ionilor Na^+ cu Ca^{2+} , alginatul de calciu fiind insolubil.

În figura nr. 7 este schematizată structura coacervatului de alginat de calciu.

Prin precipitare se includ și moleculele enzimei prezentă în soluția inițială de alginat de sodiu. Metoda este comodă și rapidă. Un dezavantaj este posibilitatea solubilizării particulelor de gel în prezența unor agenți de chelatizare pentru ionul Ca^{2+} ; pentru a mări stabilitatea operațională a aductului, se folosește frecvent metoda introducerii ionilor de Ca^{2+} în soluția de substrat.

Figura nr. 7

Asocierea cu formare de complecși cu ionul Ca^{2+} în
conseruatul de alginat de calciu



9° Geluri utilizate la includere prin precipitare

Includerea în geluri a enzimelor poate avea loc și prin precipitarea unor polimeri sintetici sau naturali, prin schimbarea unor parametri ai soluțiilor lor (solvent, temperatură, salinitate, pH). În acest fel se pot imobiliza enzime în collagen sau geluri reticulate de gelatină, agar și k-carrageenan.

Am descris mai sus (pag. 34) metoda includerii enzimelor în collagen, prin complexare macromoleculară. Rezistența mecanică a membranei obținute va crește în prezența unui agent de reticulare (glutaraldehida). În mod identic se include o enzimă în gelatină (Kennedy și colaboratorii, 1984). Gelatina este dizolvată în apă la $40-50^{\circ}\text{C}$ și amestecată cu soluția de enzimă, după care se răcește amestecul format. Gelul nu este suficient de stabil pentru a fi utilizat ca atare; reticularea este obligatorie.

Folosind agarul sau k-carrageenanul se pot include enzime

prin amestecarea la 45-50°C a soluției apoase de enzimă cu o soluție de polizaharid la aceeași temperatură. Gelul se formează prin răcire (în cazul agarului și k-carrageenanului) sau prin amestecarea soluției de enzimă - carrageenan cu sarea unui cation monovalent ca: K^+ , Rb^+ , Cs^+ și NH_4^+ (Chibata, 1978), cu amine sau cu solvenți organici miscibili cu apa (metanol sau acetonă). Gelul poate fi granulat în particule de dimensiuni dorite și uneori, pentru a le mări acestora rezistența mecanică, preparatele cu enzimă imobilizată pot fi tratate cu agenți de reticulare (tanin, glutaraldehidă, diamine). În acest caz vom avea un exemplu de imobilizare prin mecanism dublu: includere și formare de legături covalente gel-biocatalizator.

Dezavantajul major al includerii enzimelor prin metoda precipitării gelurilor constă în posibilitatea denaturării enzimei sub influența parametrilor de reacție (temperatură, solvenți organici).

I.1.2.2. Considerații asupra activității enzimelor incluse în geluri

Pentru utilizarea practică a preparatelor de enzime incluse în geluri se examinează:

- a) - proprietățile fizice și chimice ale suportului polimer;
- b) - activitatea operațională a enzimelor incluse în gel
- a) Proprietățile fizice și chimice ale polimerilor- suporturi

Rezistența mecanică și structura tridimensională a polimerului sunt doi factori de maximă însemnătate în utilizarea materialelor în bioreactoare

Astfel, suporturile anorganice sunt mai puțin elastice decât cele organice, dar mai stabile decât acestea. În același timp, polimerii organici sunt mai puțin friabili și pot fi folosiți în reactoare cu agitare.

Pentru a combina avantajele ambelor categorii se utilizează suporturi mixte. În acest scop, un material anorganic se acoperă cu un polimer organic conținând enzima inclusă.

Cea mai mare rezistență mecanică o au polimerii acrilici sub formă de perle.

Prin polimerizarea inițiată de ultrasunete se pot obține particule de polimer acrilic de dimensiuni subcelulare, conținând β -galactozidază și care prezintă o viteză de reacție foarte ridicată, datorită dispariției restricțiilor în difuzia moleculelor de substrat.

Pentru toți monomerii solubili în apă se recomandă polimerizarea în perle, care conduce la formarea unor particule cu dimensiuni de distribuție omogenă.

Polimerizarea în bloc urmată de dispersare conduce la particule de forme și mărimi neregulate, din care enzima se poate desprinde de pe suprafețele de ruptură.

b) Factori care influențează activitatea operațională a enzimelor incluse în geluri.

Cantitatea maximă de molecule active de enzimă per unitatea de volum a suportului este funcție de o combinație de factori ca: solubilitatea enzimei în amestecul inițial de monomer, masa moleculară a enzimei incluse, efectele de denaturare impuse de condițiile de polimerizare etc.

Pentru fiecare enzimă inclusă într-un anumit tip de gel se observă astfel o activitate maximă specifică față de un substrat

în funcție de: pH, tărie ionică, temperatură etc.

Studiindu-se accesul moleculelor de substrat la centrul activ al enzimei incluse, trebuie luate în considerație două **impedimente**.

- difuzia Nernst astraturilor (care survine în gradul de rotunjime a particulelor aflate într-o soluție apoasă agitată);
- difuzia restrânsă în pori, care este determinată de dimensiunile porilor, conținutul în apă al suportului și de efecte de micro - vecinătate apărute în cursul reacției enzimatică (de exemplu dacă în reacție apar ioni H^+).

Dimensiunile particulelor au un efect important în eficiența catalitică a unei enzime incluse. La concentrații egale de substrat se observă în general o creștere a vitezei de reacție cu diminuarea dimensiunilor particulelor.

Natura chimică a suportului influențează distribuția moleculelor de substrat între masa soluției și interiorul particulelor de gel [o sarcină (-) a suportului atrage o sarcină (+) a substratului măbindu-se eficacitatea]. La concentrații mici de substrat, un substrat hidrofob este convertit mai repede de către o enzimă legată pe un suport hidrofob decât pe un suport hidrofил.

Existența grupelor ionice în jurul moleculelor produce un mediu intern tamponat, astfel încât enzima va fi activă la un pH diferit de acela din restul masei. Astfel, manipulând sarcinile polimerului, este posibil să se creeze un pH favorabil în micro-vecinătatea enzimei, altul decât cel din restul soluției.

Stabilitatea preparatelor de enzime incluse în gel

Un mare avantaj al acestei metode de imobilizare este ușurința de a lega preparatele brute ale enzimelor relativ

impurificate, sau chiar celule în care enzimele prezintă o stabilitate mai mare decât în stare pură.

Factorii care influențează stabilitatea agregatelor sunt legați de inactivarea datorată atacului proteolitic sau prezenței unor materiale inhibitoare sau a unor agenți de denaturare.

Prin scăderea dimensiunilor porilor gelului, microorganismele sau enzimele proteolitice sau inhibitorii cu masă înaltă nu mai au acces la enzima imobilizată.

Alt factor important este stabilitatea termică (capacitatea enzimei de a-și păstra conformația sa activă originată și centrul său catalitic activ la încălzire). Este necesar să se utilizeze polimeri stabili ei înșiși termic, care să nu inducă schimbări conformaționale ale enzimei incluse.

De aceea, polimerii acrilici sunt cei mai recomandabili, pentru că nu prezintă modificări conformaționale între 20-100°C.

Enzimele suferă modificări drastice pe la 60°C, trecând în conformații inactive.

Prin adăugare de stabilizatori (coenzime), substrat, tampon, inhibitor, serum-albumină, se pot contracara efectele temperaturii asupra structurii enzimelor.

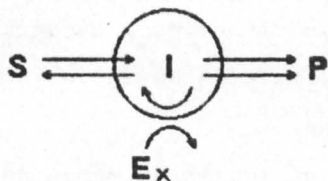
I.1.3. Encapsularea

Prin encapsulare se înțelege introducerea soluției sau suspensiei de enzimă într-o membrană semipermeabilă. Se obține astfel o „celulă” („microcapsulă”) care previne eliberarea enzimei în mediul exterior și deci contactul cu factorii din acest mediu, dar care permite accesul moleculelor de substrat în interiorul celulei artificiale ca și difuzarea produsului de reacție în afara acesteia.

Spre deosebire de metoda includerii în gel, care constă într-o includere individuală a moleculelor de enzimă în particulele de polimer, în encapsulare pot fi incluse în anvelopa membranoasă orice concentrații, volume sau cantități de enzime de diferite configurații. Se pot include de asemenea, celule întregi sau extracte celulare, alte proteine, hormoni, coenzime etc.

Celulele artificiale

O reprezentare schematică a unei „microcapsule” sau „celule” artificiale este următoarea:



în care: I = materialul intracelular;

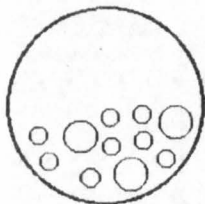
E_x = materialul extracelular;

S, P = moleculele care penetrează (substrat, produs)
membrana celulei.

În acest fel, fiecare celulă artificială inclusă într-o membrană sferică ultrafină și semipermeabilă poate conține o soluție sau o suspensie de : enzime, celule, extracte celulare și (sau) alte materiale (coenzime).

Grosimea membranei - anvelopă este de $\sim 200 \text{ \AA}$, iar raportul suprafață/volum variază în limite foarte largi. O astfel de membrană echivalează cu pori având $\phi = 0,36 \text{ \AA}$.

Se pot prepara și microcapsule mari conținând mai multe microcapsule mici cu : enzime (sistem multienzimatic) și alte proteine.



Metodele de encapsulare a enzimelor implică procedee foarte simple, fără tehnici speciale, ca în alte tehnici de imobilizare.

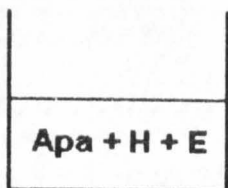
În continuare vor fi prezentate două metode de bază

I.1.3.1. Tehnici de encapsulare

- (A) Metoda cel mai des folosită prezintă avantajul unei activități remanente foarte ridicate a enzimei imobilizate. Aceasta este o metodă pur fizică de imobilizare și a fost folosită pentru microencapsularea hemoglobinei separată din hematii, obținându-se celule artificiale cu o concentrație înaltă de hemoglobină.

Ca instalație se folosește un vas (flacon) cu agitare magnetică. Etapele urmate sunt următoarele:

- Se prepară o soluție tamponată (pH ~ 8,5) de enzimă în 10% hemoglobină apoasă:

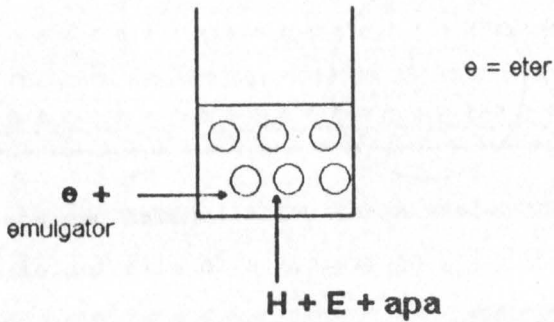


H = hemoglobină

E = enzimă

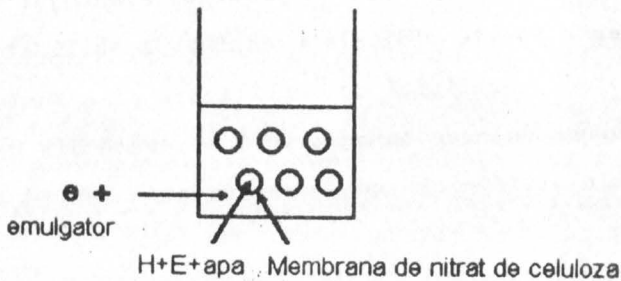
- Se adaugă la soluția astfel obținută, sub agitare, eter saturat cu apă și un emulgator (de tip apă în ulei) pentru stabilizarea emulsiei.

Se formează o emulsie:



- După o agitare de câteva secunde, pentru formarea membranei semipermeabile a celulelor de hemoglobină se adaugă o soluție eterică de nitrat de celuloză.

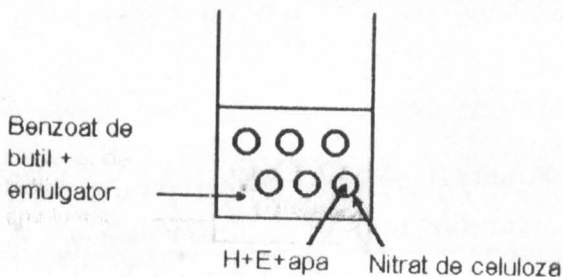
Se formează membrana semipermeabilă a microcapsulelor:



Supernatantul se îndepărtează prin decantare sau centrifugare.

- Se adaugă un solvent organic (benzoat de butil) conținând o cantitate mică de emulgator (apă în ulei)

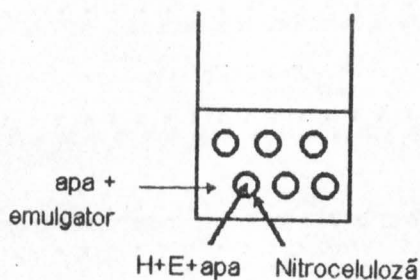
Se formează:



După o agitare de 30 secunde și un timp de ședere de 30 minute la 4°C urmează transferul enzimei encapsulate din mediul organic în mediu apos. Pentru aceasta se parourg următoarele etape:

- Se îndepărtează complet supernatantul (benzoat de butil). In cazul în care microcapsulele au un $\phi \geq 50 \mu m$ ele se sedimentează complet prin ședere timp de 30 minute. In cazul în care diametrul microcapsulelor este mai mic, pentru decantare se centrifughează 5 minute.

- După îndepărtarea supernatantului, se adaugă apă distilată conținând un emulgator. Se obține:



După o agitare de 10-30 secunde se diluează emulsia cu apă distilată, se decantează supernatantul ușor opalescent prin centrifugare, după care se spală microcapsulele cu apă distilată până la îndepărtarea totală a enzimei nefixate și a benzoatului de butil (care poate afecta permeabilitatea membranei).

Microcapsulele separate în stare pură se păstrează la frigider, într-o soluție apoasă de NaCl.

Variația diametrului celulelor astfel obținute ($\phi_{\text{mediu}} \sim 80 \mu m$) depinde de gradul de emulsionare. Se evită o agitare prea energetică și îndelungată ca și o centrifugare prelungită a micro-

capsulelor, care poate duce la spargerea lor în celule de dimensiuni prea mici, greu de separat și stabilizat și cu o concentrație mai scăzută de enzimă.

— (B) A doua metodă de encapsulare este de fapt o metodă chimică și este o extindere a metodei descrise mai sus, în care microcapsula are o membrană semipermeabilă de nylon. Membranele de nylon sunt mai stabile decât cele de nitroceluloză, totuși unele enzime (catalaza) se inactivează prin acest procedeu. Membrana se formează prin policondensare chiar în cursul encapsulării.

Se folosesc 2 metode: - tehnica (foarte simplă) a „picăturilor”

- tehnica emulsionării (polimerizarea interfacială)

1) Tehinca picăturilor este extrem de simplă și se folosește pe scară largă pentru a prepara microcapsule mari, conținând enzime dizolvate în soluție apoasă de hemoglobină. Deși are o utilizare extinsă (se obțin un număr mare de microcapsule semipermeabile), tehnica aceasta necesită un timp mai îndelungat și conduce la celule cu $\phi > 1$ mm.

Modul de lucru

Metoda se bazează pe includerea unei soluții apoase conținând enzima (amestec de enzime sau extracte celulare, coenzime etc.) în celule artificiale cu membrane de policondensate de tip poliamidic. Reacția de formare a membranei semipermeabile (policondensarea) are loc concomitent cu encapsularea propriu-zisă.

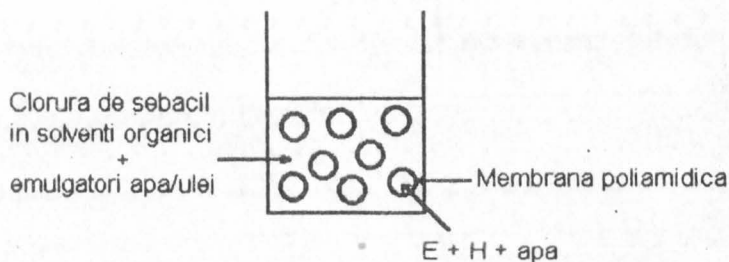
S-a lucrat tot cu o soluție sau o suspensie apoasă de enzimă (sau amestec de enzime, sau extracte celulare brute) în hemoglobină 10%.

Se folosesc ca precursori de policondensare:

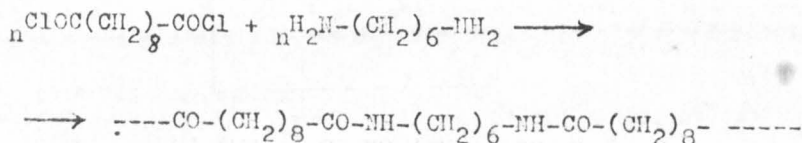
- o soluție apoasă alcalină de 1,6-hexametilendiamină;
- o soluție de clorură de sebacil într-un solvent organic (cloroform + ciclohexan);
- un emulgator de tip apă în ulei.

Se procedează astfel:

Intr-un flacon prevăzut cu agitator magnetic se introduc soluția organică de clorură de sebacil și emulgatorul. Prin agitare magnetică ușoară se adaugă cu ajutorul unei seringi din sticlă amestecul de: soluție apoasă de enzimă în hemoglobină + soluția apoasă alcalină de 1,6-hexametilendiamină. Acul seringii se alege în funcție de dimensiunile microcapsulelor ce urmează a se obține ($\emptyset$). Se agită ușor timp de 5 minute, când se obțin microcapsule cu membrană poliamidică:



Reacția de formare a membranei de tip "nylon" din precursori va fi:



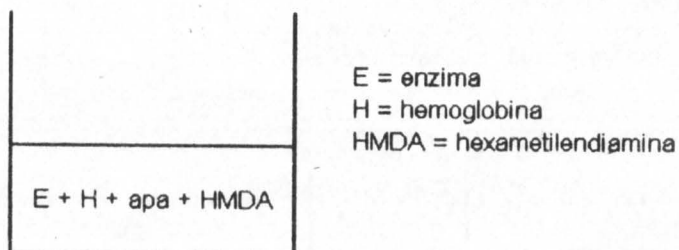
După formarea microcapsulelor, supernatantul organic trebuie îndepărtat complet prin decantare și evaporare (deoarece influențează permeabilitatea membranei).

Microcapsulele se spală și se păstrează la frigider în soluție apoasă de NaCl.

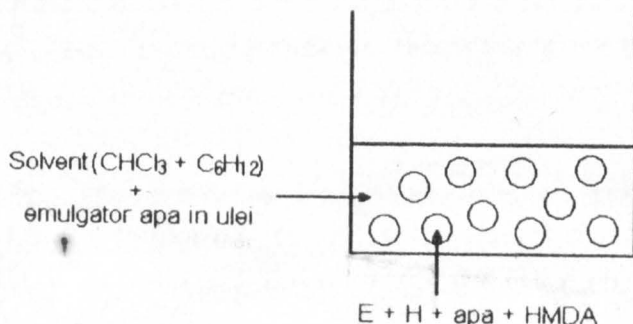
2) Tehnica emulsionării

Modul de lucru

Într-un balon prevăzut cu agitator **magnetic** și plasat într-o baie de gheață, se introduce soluția (suspensia) de enzimă în hemoglobină apoasă 10% și apoi se adaugă sub agitare blândă soluția alcalină de hexametilendiamină. Se obține un amestec omogen:

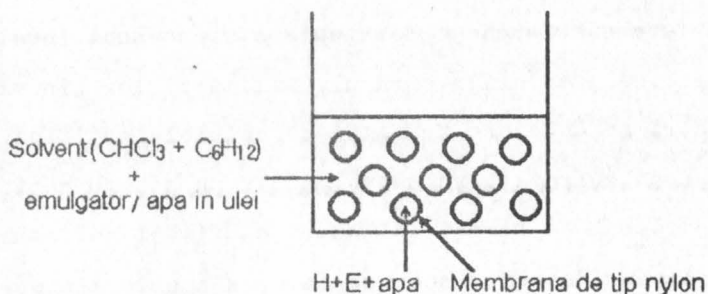


Pentru omogenizare se mai agită 10 secunde, după care se adaugă o soluție de emulgator de tip apă în ulei într-un amestec de $\text{CHCl}_3 + \text{C}_6\text{H}_{12}$. Se agită 60 secunde. Se formează o emulsie:

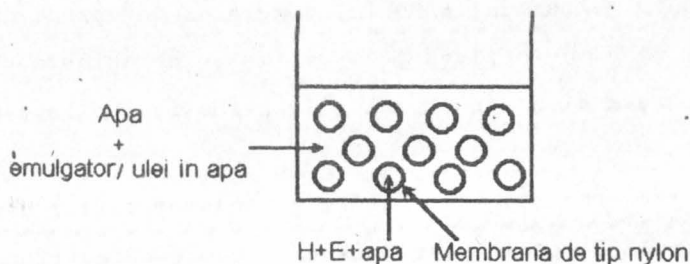


La emulsia astfel obținută se adaugă o soluție de clorură de sebacil în $\text{CHCl}_3 + \text{C}_6\text{H}_{12}$ + emulgator apă în ulei și se agită 3 minute.

Se formează:



Se oprește agitarea și se centrifughează pentru îndepărtarea supernatantului, după care se adaugă peste microcapsulele izolate o soluție de emulgator (de tip ulei în apă) în apă distilată (pentru transferul microcapsulelor din faza organică în faza apoasă). Se obține:



După o agitare de 30 secunde se diluează cu apă distilată, se agită și se decantează (sau centrifughează) supernatantul. Se repetă operația de spălare cu apă până la îndepărtarea

completă a urmelor de enzimă nereținută și de substanțe organice; microcapsulele se păstrează în soluție 1% de NaCl.

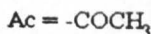
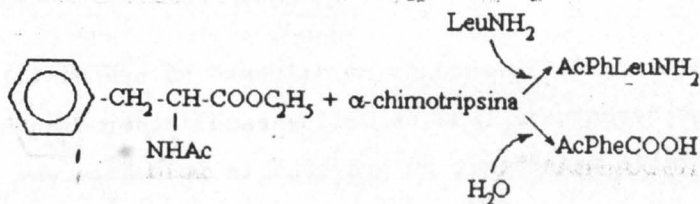
Această tehnică permite obținerea de microcapsule semipermeabile cu $\varnothing \sim 50 \mu\text{m}$.

Microencapsulările enzimelor utilizate la obținerea unor celule artificiale în care suspensiile sau soluțiile de enzime sau extracte celulare sub formă de particule sferice sunt învelite cu membrane ultrafine prezintă avantajul utilizării lor „in vivo”. Aceste utilizări se datoresc faptului că celulele artificiale au un raport ridicat suprafață/volum permițând un schimb rapid între substrat și produsul de reacție și numai cantități neînsemnate de polimer se introduc în corp, ceea ce face ca aceste microcapsule să fie injectabile sau implantabile în țesuturi.

Activitatea enzimatică este strict localizată în interiorul microcapsulei.

Se pot imobiliza prin encapsulare un mare număr de enzime ca: ureaza, anhidraza carbonică, uricaza, tripsina, catalaza, asparaginaza, lipaza, α -glucozidaza, fenolaza, nitratreductaza, β -fructofuranozidaza, lactaza, fosfataza alcalină, glucozooxidaza etc. dar și: amestecuri de enzime și hemoglobină din hemolizatele de celule roșii, albumina, lisosim, complexul de enzime din drojdie, precum și alte amestecuri de enzime ca hexakinaza-piruvat-kinaza, corespunzătoare unor reacții enzimatică polisecvențiale.

S-a sintetizat recent (Serralheiro și colaboratorii) dipeptida acetilfenilalanilileucină (AcPheLeuNH_2) cu α -chimotripsină



Injectând o soluție de leucină ($\text{Leu}^{\text{H}}\text{H}_2$) și enzimă în tampon carbonat într-o soluție ce conține $\text{AcPh-COOC}_2\text{H}_5$ în heptan + CHCl_3 (1:1) și un emulgator (bromura de tetradeciltrimetilamoniu) se obțin microcapsule reversibile.

Clasificarea microcapsulelor se face după tipurile de membrane.

I.1.3.2. Tipuri de membrane semipermeabile

Membranele se clasifică în două mari categorii:

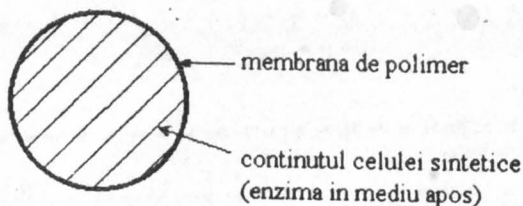
- a) Sintetice
- b) Biologice și biodegradabile

Un caz aparte al microcapsulelor sunt lipozomii, cu multiple întrebuințări în medicină.

a) Tipuri de membrane sintetice

În funcție de tehnica encapsulării ca și de scopul în care urmează a fi folosite preparatele enzimatice obținute, se disting mai multe tipuri de membrane sintetice.

a.1. Membrane de polimer sferice ultrafine

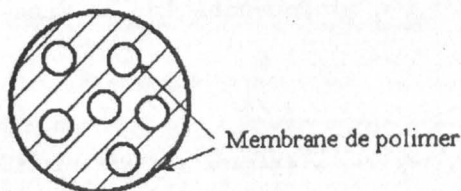


Cel mai des se folosesc membranele de nitrat de celuloză obținute după metoda fizică a emulsionării (au dimensiuni celulare). Asemenea membrane se mai pot obține și prin metoda

polimerizării interfaciale (membranele de nylon).

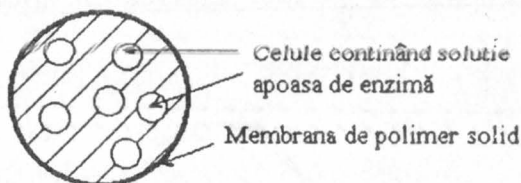
Se mai pot obține membrane cu structură mixtă nylon-proteină sau membrane proteinice reticulate (prin metode chimice).

a.2. Sisteme de membrane multiplu compartimentate



O membrană sferică ultrafină poate conține un număr de enzime microencapsulate, compartimentate pe diferite tipuri de reacții. Astfel, o microcapsulă mare formată dintr-o membrană de nylon sau de proteină reticulată poate servi la encapsularea unor celule artificiale mai mici care conțin diferite enzime. Asemenea microcapsule prezintă interes pentru sistemele multienzimatice cu acțiune secvențială în reacții cu mai multe etape.

a.3. Membrane solide obținute printr-o emulsionare secundară („dublă emulsionare”)



Emulsionarea secundară este o metodă fizică de microencapsulare. Astfel, în prima fază soluția apoasă de enzimă sau proteină este emulsionată într-o soluție organică de polimer, după cum s-a descris mai înainte.

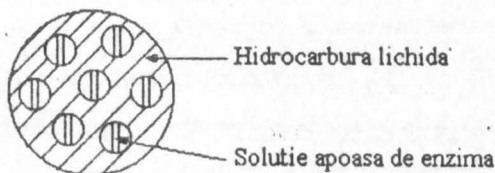
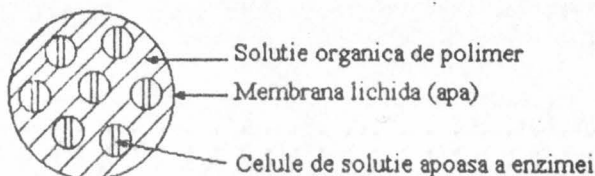
Soluția organică de polimer conținând micropicături de soluție apoasă de enzimă se dispersează a doua oară într-o fază

apoasă , formându-se a doua emulsie. Prin îndepărtarea solven-
tului organic polimerul se solidifică formând sfere solide, ce
conțin fiecare un număr de micropicături de soluție apoasă de
enzimă (proteină).

Tehnica dublei emulsionări este simplă dar membranele de
polimer obținute sunt mai groase și mai puțin permeabile.

Drept polimeri pentru encapsulatele de enzime (proteine) se
folosesc: polistiren, cauciuc siliconic (Silastic), acid poli-
lactic, materiale celulozice, diverși polimeri biodegradabili.

a.4. Membrane lichide obținute prin dublă emulsionare



Este o variantă a emulsionării secundare, care în loc de un
polimer solid folosește o membrană lichidă.

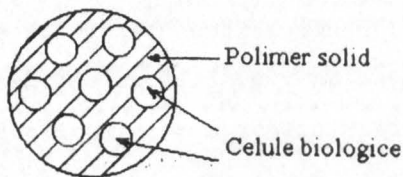
Ca principiu general, soluția apoasă a enzimei este emulsi-
onată întâi într-un solvent organic (hidrocarbură sau o soluție
organică de polimer). Emulsia de tip apă în ulei astfel obținută
este dispersată a doua oară într-o fază apoasă, formându-se
emulsia dublă.

Fiecare microcapsulă obținută va conține mai multe picături
de soluție apoasă de enzimă incluse fie într-o soluție organică

de polimer, fie într-o hidrocarbură lichidă.

a.5. Membrane sintetice cu celule biologice

Celulele biologice se pot microencapsula în membrane de nylon, nitrat de celuloză sau de proteine reticulate, injectându-le în microcapsule preformate:

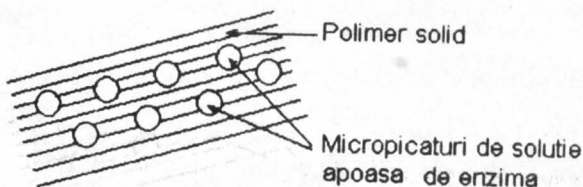


Se pot encapsula și microorganisme în sferele de polimer solid.

a.6. Membrane sub formă de fibre

În afară de membrane sferice polimere conținând micropicături de enzime și proteine, microencapsularea mai cunoaște și alte configurații.

Astfel, după emulsionarea soluției apoase de enzimă în soluția organică a polimerului emulsia obținută poate fi extrudată. Rezultă fibre, fiecare din ele conținând micropicături de enzime sau proteine:



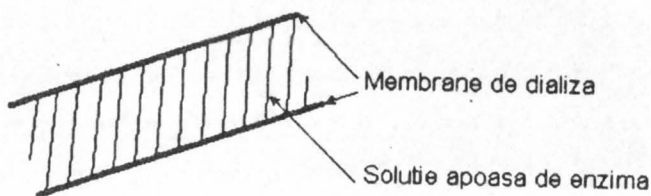
Metoda este avantajoasă prin posibilitatea utilizării fibrelor în reactoarele enzimaticе, fibrele fiind stabile la acțiunea solventilor organici, a electrolitilor, a acizilor și bazelor tari.

Utilizarea acestor fibre este limitată la substratele cu masă moleculară mică, datorită accesului steric dificil. Se aplică în special la imobilizarea 6-penicilinacilazei (6-APA) și a β -galactozidazei, fibrele fiind introduse în bioreactoare-co-loană.

a.7. Encapsularea în membrane de dializă

Microencapsularea în membrane sferice ultrafine, semipermeabile este în ultimă instanță un sistem de microdializă în care enzimele sunt puse să acționeze asupra unui substrat exterior prin dializă, substratul și produsul de reacție penetrând membrana microcapsulei.

De aceea se pot plasa enzimele în sisteme de membrane dializoare standard, prin utilizarea unor celule artificiale (microcapsule) cu valori enorme ale raportului suprafață/volum și cu membrane ultrafine.



Metoda se folosește pentru construcția unor sisteme medicale „extracorporale”, dar nu și pentru implantări „intracorporale”.

b. Tipuri de membrane biologice și biodegradabile

Asemenea membrane se folosesc pentru implantări, fiind compatibile cu organismul și ușor de îndepărtat prin metabolizare, ceea ce evită acumularea acestor materiale în organism.

Printre asemenea tipuri de membrane ale celulelor artificiale se numără:

b.1. Membrane sferice ultrafine de proteine reticulate

Dacă în metoda de preparare a celulelor artificiale așa-zisă „a picăturilor” (de polimerizare interfacială) nu se introduce diamina în soluție apoasă ci se adaugă ca atare, ca agent de reticulare a enzimei, se obțin membrane sferice ultrafine, de proteină (enzimă) reticulată, ușor biodegradabile (în loc de membrane de nylon).

b.2. Membrane de polimer complexat cu heparină

În cazul în care enzimele încapsulate urmează a veni în contact cu sângele, este de dorit complexarea membranei cu heparină, pentru a se preveni coagularea sângelui.

Metoda se aplică atât la membranele de nylon cât și la cele de nitrat de celuloză pentru a le face compatibile cu sângele.

b.3. Membrane sferice ultrafine de lipide

Se pot prepara microcapsule de hemolizate de globule roșii având membrane sferice de lipide, ultrafine, formate dintr-un strat dublu de lipide (grăsimi). Pentru aceasta se dispersează soluția apoasă într-o grăsime în prezența unui emulgator.

b.4. Membrane de lipide complexate

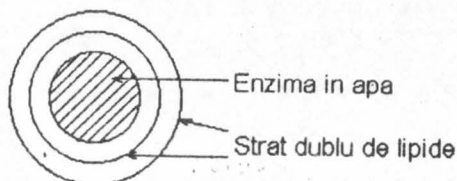
Membranele sferice ultrafine de enzime reticulate s-au complexat cu lipide pentru a forma o membrană lipido-proteinică conținând sisteme complexe de enzime și proteine pentru hemolizatul de globule roșii.

Atât stabilitatea cât și rezistența acestor membrane sunt mult mai mari decât ale membranelor sferice cu dublu strat lipidic.

Lipidele mai pot fi complexate și în membranele sferice ultrafine de nylon.

b.5. Lipozomi

Lipozomi sunt sfere lichide microscopice, fiecare din ele fiind constituite din straturi concentrice duble de lipide:



Acestea sunt lipide insolubile în apă, polare, ca:
fosfatidil-etanolamină

-colină

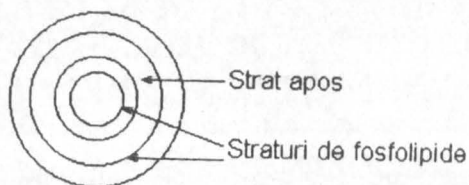
-serină,

cardiolipide, acizi fosfatidici, care în contact cu apa formează conglomerate datorită unor perturbări de natură termodinamică a interacțiunilor de tip apă-apă, apă-ulei și ulei-ulei.

Se formează astfel structuri înalt-ordonate, stabile în mediu apos, sub forma unui sistem de membrane concentrice închise fiecare dintre ele reprezentând o peliculă bimoleculară de lipide.

Sunt trei tipuri de lipozomi:

- Multilamelari - formați din mai multe straturi duble de fosfolipide, de forma unor sfere concentrice, alternând cu compartimente apoase:



- Monolamelari - se obțin prin ruperea cu ultrasunete a celor multilamelari.

- Macroveziculari - formați dintr-un singur strat sau un număr mic de straturi bimoleculare, cu un diametru $\sim 1 \mu\text{m}$.

Includerea enzimelor în lipozomi este deosebit de importantă pentru administrarea lor ca agenți terapeutici. Pentru aceea enzimele nu trebuie în nici un caz să penetreze stratul de lipidă, pentru a nu provoca în organism reacții imunologice. Dacă este necesar să se evite acest fenomen nedorit, suprafața lipozomilor este tratată cu protează nespecifică, de înaltă puritate.

Metode pentru includerea enzimelor în lipozomi

Prepararea de lipozomi conținând enzime este extrem de simplă. Astfel, lipidele se dizolvă într-un solvent organic care apoi va fi eliminat la presiune redusă, pe pereții balonului în care are loc evaporarea formându-se un film subțire de lipidă. Aceasta lipidă se dispersează apoi cu o soluție apoasă de enzimă formându-se spontan lipozomii ce conțin enzima.

Înainte de separarea lor de enzima neinclusă, lipozomii sunt micșorați prin ultrasonare, obținându-se structuri monolamelare.

Intr-o altă variantă pentru obținerea lipozomilor monolamelari, o soluție de fosfolipidă într-un solvent organic este stratificată pe suprafața fazei apoase care conține solutul (enzima), după care solventul este îndepărtat cu un curent de

gaz inert.

Există un dezavantaj al acestei metode: contactul solventului cu soluția apoasă a enzimei poate duce la denaturarea acesteia.

Drept componentă lipidică a lipozomilor pe lângă fosfolipide (cele mai des folosite) se mai poate utiliza lecitina naturală (din ou).

Pentru organismul uman se preferă lecitinele sintetice, deoarece cele naturale se contaminează foarte ușor cu substanțe imunogene. Uneori este necesar adăosul de colesterol sau ergosterol pentru a mări stabilitatea straturilor lipidice duble de lecitine sintetice.

Unul din cele mai mari avantaje practice ale lipozomilor este ușurința cu care ei transportă diverse proteine sau enzime la centrele reactive, selectate, intracelulare, mai ales în sistemul reticuloendotelial.

b.6. Enzime encapsulate în eritrocite

Membrana eritrocitelor prezintă o permeabilitate normală numai pentru moleculele foarte mici. Encapsulând enzime în interiorul globulelor roșii, aceste preparate sunt biocompatibile. Metoda are aplicabilitate restrânsă datorită permeabilității scăzute a membranelor globulelor roșii față de majoritatea moleculelor de enzime.

b.7. Membrane polimere biodegradabile

Unul din motivele principale ale utilizării microcapsulelor cu membrane din materiale biodegradabile este acela că după injectarea în corp, membrana poate fi metabolizată și eliminată.

Astfel, pentru injectarea enzimelor și hormonilor se utilizează encapsulate în membrane de acid polilactic.

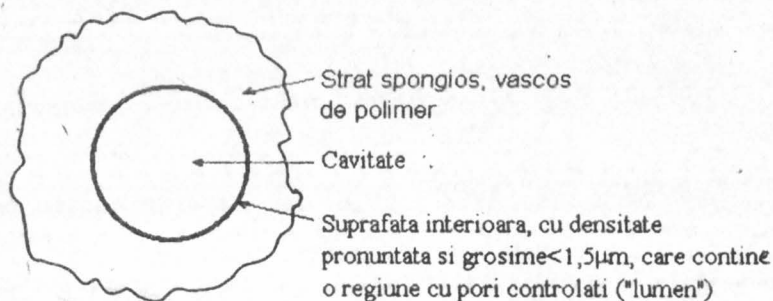
Variante mai puțin utilizate ale metodei încapsulării sunt:

- Încapsularea în suspensii, cu orice tip de suport, particule de adsorbanți ca: rășini schimbătoare de ioni, fosfat de zirconiu, etc., adăugate la faza apoasă și microencapsulate odată cu enzima.
 - Microencapsularea magnetică, în care mici particule de fier sau alt material magnetic se încapsulează odată cu enzimele, realizând microcelule magnetice, semipermeabile, folosite în sisteme extracorporale pentru a controla și localiza deplasarea enzimelor microencapsulate, folosind curenți magnetici externi.
 - Sisteme multiplu compartimentate, de microcapsule conținând mai multe enzime, fiecare corespunzând unei etape a unei reacții enzimatică multisevențiale.
 - Sisteme multienzimatică pentru recircularea coenzimelor. Un preparat cu hexokinază și piruvat-kinază poate folosi la recircularea ADP/ATP. Alte sisteme de acest tip se pot folosi pentru recircularea NAD^+/NADH .
 - Microencapsularea enzimelor și proteinelor marcate radioactiv (de exemplu, hemoglobină cu ^{51}Cr).
- În concluzie, se poate spune că microencapsularea enzimelor are următoarele consecințe și avantaje:
- obținere de celule artificiale cu conținut intracelular;
 - acțiunea asupra substanțelor dializabile având dimensiunile polipeptidelor, dar nu ale proteinelor;
 - echilibrarea rapidă a substratelor datorată membranelor ultrafine cu o valoare înaltă a raportului suprafață/volum;
 - o cantitate de suport neglijabilă față de enzimă (1:10.000);
 - posibilitatea imobilizării unor sisteme complexe: extracte și organite celulare, celule, enzime multisevențiale, cofactori, vaccinuri, antigene, antiseruri, hormoni;

- stabilizarea enzimei;
- evitarea reacțiilor imunologice și de hipersensibilitate;
- sisteme enzimatiche multicompartimentate;
- enzime coimobilizate cu adsorbantii, materiale magnetice etc.;
- posibilitatea utilizării de membrane biodegradabile.

I.1.4. Imobilizarea enzimelor pe membrane de „Hollow-fibers”

În această metodă de imobilizare fizică, enzimele se fixează pe membrana semipermeabilă („lumenul”) unei fibre („hollow-fiber”). Membrana este impermeabilă pentru enzimă, dar permeabilă pentru substrat și produsul de reacție. În secțiune transversală o asemenea membrană-fibră arată astfel:



Imobilizarea pe asemenea membrane prezintă unele avantaje:

- este simplă și rapidă;
- nu se produc alterări chimice ale enzimei;
- proprietățile cinetice ale enzimei imobilizate rămân nemodificate față de cele ale enzimei libere;

- structura membranei semipermeabile împiedică accesul la enzimă al microbilor și anticorpilor;

- metoda se pretează la coimobilizarea unui număr mai mare de enzime (selectivitatea membranei permite un control selectiv al substratelor și produșilor de reacție). Se pot imobiliza și coenzime;

- valoarea ridicată a raportului suprafață/volum (deci capacitate mare de adsorbție);

- alegând fibre corespunzătoare poate fi evitată scindarea (ruperea) moleculei de enzimă în cursul reacțiilor;

- metoda poate fi adaptată unui proces continuu la presiuni variabilă.

Dar metoda prezintă și unele dezavantaje:

- limitarea vitezei de reacție ca rezultat al rezistenței membranei;

- dificultatea de a lucra cu soluții de substrat de concentrații mici.

I.1.4.1. Dispozitive de membrane de „Hollow-fiber”

Un număr mare de firme produc atât fibrele comerciale cât și dispozitive de laborator care pot fi transpuse la scară industrială. Există două tipuri de dispozitive ce conțin pachete de „Hollow-fiber.”.

a) Dispozitiv tubular

Schema generală este prezentată în fig.8.

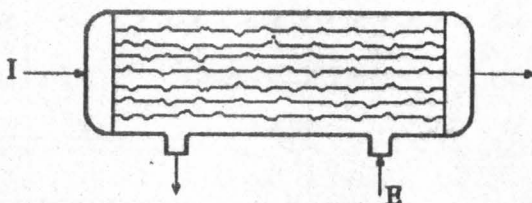
Se observă existența a două compartimente:

I = Spațiul interior (lumen) al fibrelor și

E = Spațiul exterior al fibrelor

Fig. nr. 8

Dispozitiv tubular

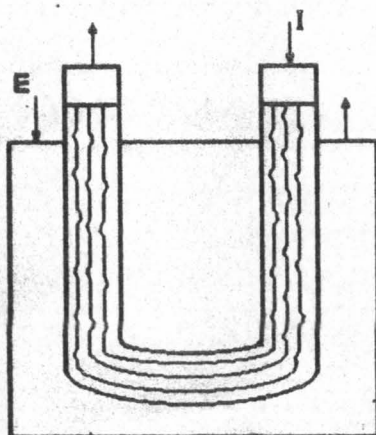


b) Dispozitiv în „U” („cupă”)

Schema generală este prezentată în fig.nr.9

Fig. nr. 9

Dispozitiv în „U”



Se folosesc în mod uzual două feluri de „Hollow-fiber ”

- celulozice și

- de tip nylon

Incintele în care sunt introduse aceste dispozitive sunt confecționate din sticlă sau teflon.

In tabelul Nr. 7 sunt date câteva exemple de membrane comerciale.

Tabelul Nr. 7

Exemple de membrane comerciale de „Hollow-fiber”

Firma prod.	Denumire comerc.	Aria supraf. (cm ²)	Tipul de membrană	Diam. interior (μm)	Tip	Geometrie
1	2	3	4	5	6	7
Amicon (USA)	P ₅	560	Poli- sulfonă	500	Anizotropie	Tubular
	P ₈	560	Poli- sulfonă	500	Anizotropie	Tubular
	P ₁₀	930	Poli- sulfonă	200	Anizotropie	Tubular
	X ₅₀	930	Copolimer acrilic	200	Anizotropie	Tubular
	P ₁₀₀	740	-	200	Anizotropie	Tubular
BioRad (USA)	B-20	50	Acetat de celuloză	200	Izotropie	Tubular
	B-50	50	Celuloză	200	Izotropie	Tubular
	B-80	50	Acetat de celuloză	200	Izotropie	Tubular
	B-20	1,000	Acetat de celuloză	200	Izotropie	Cupă
	B-50	900	Celuloză	200	Izotropie	Cupă
	B-80	1,000	Acetat de celuloză	200	Izotropie	Cupă
Cordis (USA)	CDAK	10,000	Celuloză	225	Izotropie	Tubular

Tabelul Nr. 7 (continuare)

1	2	3	4	5	6	7
Romicon (USA)	20PM10	1,700	Polimer cu cicluri aromatice	500	Anizotropio	Tubular
	20-XM50	2,300	Poli- olefină	500	Anizotropio	Tubular
	45-XM50	1,000	Poli- olefină	1100	Anizotropio	Tubular
	20-GM80	2,300	-	500	Anizotropio	Tubular

I.1.4.2. Tipuri de membrane

1°. Membranele de „Hollow-fiber” se aleg în funcție de mai mulți factori:

a) Retenția solutului este un parametru determinat empiric prin ultrafiltrare. Astfel, o soluție cu o concentrație cunoscută dintr-un solut este circulată prin spațiul I (intern), sub presiune (ultrafiltrare). La ieșire, fluidul este colectat în spațiul E(exterior) al fibrelor și i se determină concentrația în solut.

Capacitatea de retenție a membranei depinde nu numai de masa sa moleculară, dar și de configurația moleculară a solutului.

Raportul concentrație la intrare/concentrație la ieșire a fost denumit factorul „F” sau fracția reținută (tabelul Nr.8). Acesta „fracție reținută” depinde de permeabilitatea membranei, de debitul soluției și de concentrația sa inițială, de condițiile de lucru etc. și este o măsură relativă a porilor membranei capabili de a separa (reține) solutul în funcție de

masa moleculară.

Tabelul Nr. 8

Exemple de fracții de retenție pentru unele tipuri de
„Hollow-fiber”

Solutul	Fracția reținută (F)				
	B-20	P ₁₀	B-50	X ₅₀	B-80
Urea	50	0	0	0	0
Creatinina	79	0	0	0	0
Zaharoza	95	0	0	0	0
Rafinoza	-	0	0	0	0
Vitamina B 12	-	-	2	0	0
Bacitracina	-	55	-	0	0
Inulina	-	10	82	-	-
Citocrom C	-	90	95	80	10
Ribonuclează	-	90	-	30	-
Mioglobina	-	90	-	40	30
α -Chimotripsinogen	-	90	-	75	-
Pepsina	-	95	-	-	85
Ovalbumina	-	98	-	90	-
BSA (serum albumină bovină)	-	95	-	90	98
Dextran 110	-	30	-	10	-
Aldolaza	-	98	-	95	-
Ig G	-	98	-	98	-

Retenția solutului este influențată și de tăria ionică și pH-ul soluției supuse ultrafiltrării.

Retenția enzimelor se determină în condițiile experimentale în care urmează a fi utilizat dispozitivul cu enzimă imobilizată.

b) Permeabilitatea dialitică a membranei

Permeabilitatea se referă la posibilitatea de difuzie a moleculelor de solut prin membrană. Pentru solute cu mase foarte mici se observă că permeabilitatea dialitică este aproape similară, indiferent de natura membranei.

În general permeabilitatea unei membrane se bazează pe mărimea ariei geometrice disponibilă pentru difuzie.

Tabelul Nr. 9

Permeabilitatea dialitică a unor membrane „Hollow-fiber.”

Solutul	Permeabilitatea membranei (cm/min.1000)				
	B-20	B-50	P ₃₀	X ₅₀	B-80
Etanol	1,5	-	-	-	-
Acetaldehidă	0,42	-	-	-	-
Acid acetic	0,030	-	-	-	-
Clorură de sodiu	0,042	29	49	46	-
Uree	1,8	25	31	27	32
Creatinină	-	16	34	22	17
Acid uric	-	14	18	17	-
Rafinoză	-	4,2	-	-	8,0
NAD	0	1,8	-	-	-
Vitamina B 12	0-	1,5	-	-	6,0
Bacitracina ¹²	-	1,5	4,1	11,4	-
Inulina	-	0,4	1,8	10,4	-
BSA	-	0	-	-	0,014

Pentru fiecare tip comercial de membrană (tabelul Nr.9) sunt tabelate valorile generale ale permeabilității, care depind atât de permeabilitatea dialitică a membranei cât și de efectul difuziei Nernst a stratului de fluid în spațiul interior al fibrelor și în cel dinafara lor. Efectul Nernst variază în funcție de condițiile de lucru (în special de mărimea debitului soluției introduse).

Pentru un transport mai rapid al solutului prin membrană se utilizează ultrafiltrarea. Fiecare membrană în parte se caracterizează printr-o permeabilitate hidraulică determinată la trecerea apei deionizate printr-un număr de „Hollow-fiber” (tabelul Nr. 10).

Tabelul Nr. 10

Permeabilitatea hidraulică a unor „Hollow-fiber” comerciale

Hollow-fiber	Flux de apă deionizată (ml/cm ² . min. atm. 10,000), H
Biofiber 20	1,0
Biofiber 50	9,5
Biofiber 80	86
P ₅	300
20-PM 10	800
P ₁₀	1500
20-GM 80	2500
X ₅₀	3000
P ₁₀₀	6000

c) Efectul concentrației locale a solutului

Ca rezultat al ultrafiltrării solventului apare fenomenul de concentrare locală a solutului reținut pe membrană.

Forțând solventul (sub presiune) să treacă prin membrana fibrelor, solutele cu masă moleculară suficient de mare sunt reținute parțial sau total de membrană. Retenția accentuată determină creșterea concentrației locale a solutului, ceea ce poate afecta dramatic performanța membranei, reducându-i mult capacitatea de ultrafiltrare.

Concentrația în solut reținut depinde atât de forțele care se formează pe suprafața membranei cât și de solubilitatea solutului. Pentru a evita acest neajuns se micșorează concentrația solutului în soluție sau se mărește suprafața totală de reținere (se folosesc membrane de „Hollow-fiber” cu pori foarte fini pe suprafața lumenului).

d) Compatibilitatea membranei este un factor care restrânge mult aplicabilitatea metodei. Atât membranele de polimeri celulozici cât și cele de polimeri de tip nylon sunt foarte labile la influențele soluției înconjurătoare. De aceea înainte de a alege o membrană sau alta, se examinează durabilitatea lor în soluțiile folosite atât în procesul de imobilizare a enzimei, cât și în cursul operațiilor de preluorare (spălare, sterilizare) a agregatului.

2°. Membrane lichide, semipermeabile, de „Hollow-fiber”

Membranele semipermeabile de „Hollow-fiber” sunt selective la masa moleculară și configurația solutului. Pe de altă parte membranele lichide au o mare permeabilitate selectivă.

Se pot combina avantajele celor două tipuri de membrane impregnând „Hollow-fiber” semipermeabile cu fluorocarburii

lichide (care împiedică pătrunderea moleculelor foarte polare sau încărcate electric).

Acest lucru se poate realiza practic pe două căi:

A) - Dispozitivul de „Hollow-fiber ” este imersat în poziție verticală într-un vas cu un strat subțire de lichid de impregnare nemiscibil cu apa. Lichidul urcă prin capilaritate și impregnează fibrele, atât în spațiul interior (lumen) cât și în spațiul exterior al fibrelor.

B) - Se poate face filarea într-un vas conținând hidrocarbură.

Dispozitivele obținute prin unul din aceste procedee se lasă în poziție orizontală timp de 2 zile la temperatura camerei, pentru incubare, după care se spală cu apă distilată și apoi cu o soluție tampon.

Asemenea membrane nu se supun presiunii variabile deoarece stratul subțire de fluid impregnat pe fibre se poate desprinde.

I.1.4.3. Tehnici de imobilizare a enzimelor pe membrane de „Hollow-fiber.”

A) Imobilizarea enzimelor din soluții

Metoda este cea mai răspândită și se utilizează la enzime solubilizate. Proprietățile cinetice ale enzimei rămân intacte și după imobilizare.

Se folosesc mai multe procedee:

- Soluția de enzimă se plasează ca fluid staționar fie în spațiul din afara fibrelor, fie în spațiul interior (lumen).

Se preferă totuși o recirculare lentă a soluției de enzimă prin aceste compartimente. În soluție se mai adaugă și serum albumină bazică pentru a proteja enzima de la suprafață de o eventuală

inactivare.

- Alt procedeu constă în incubarea fibrelor cu o soluție de enzimă, un anumit timp.

Proprietățile membranei se pot modifica la utilizare datorită gonflării polimerului, adsorbției proteinei și substratului, salinității sau existenței unor microdefecte.

Din această cauză, dispozitivele cu enzime imobilizate pe membrane de „Hollow-fiber.” dau rezultate nereproductibile în timp, utilizarea lor fiind restrânsă la un număr mic de determinări succesive.

Efectul de gonflare ce poate apare în timpul incubării cu soluția de proteină, poate determina desprinderea acesteia de pe suport.

Majoritatea „Hollow-fiber.” semipermeabile au o microstructură foarte delicată, ușor influențabilă mai ales la contactul cu solvenții organici. Particulele rigide aflate în soluție pot bloca spațiul dintre fibre, producând tasarea acestora.

Ca mod de lucru general la efectuarea unei reacții enzimatice cu un dispozitiv cu enzima imobilizată pe „Hollow-fiber.”, se pompează în contracurent soluția de enzimă printr-unul din compartimentele dispozitivului și soluția de substrat prin celălalt.

B) Imobilizarea cu enzime solubile modificate

Pentru creșterea solubilității enzimei imobilizate, soluția proteinei se poate modifica prin adăugarea unui adsorbant solubil (dextran) sau insolubil (DEAE-celuloză). Astfel, la o soluție de chimotripsină se adaugă un dextran solubil. Soluția obținută se trece prin ultrafiltrare printr-un reactor cu „Hollow-fiber” polimerice. În reactor se introduce în flux continuu o soluție de caseină (substrat). Enzima preadsorbită și fixată pe „Hollow-

fiber." devine mult mai stabilă decât enzima nativă, preparatul rămânând operațional chiar și după două săptămâni.

C) Imobilizare cu suspensii de enzime

O tehnică alternativă pentru stabilizarea enzimelor este o preimobilizare pe mici particule care se circulă sau se plasează în spațiul interior al „Hollow-fiber”. Procedul elimină efectele difuziei Nernst a straturilor lichide pe suprafața lumenului fibrelor.

De exemplu, tripsina se imobilizează prin legare covalentă pe perle de poliacrilamidă. Suspensia obținută se circulă prin spațiul din interiorul „Hollow-fiber.” plasate într-un vas ce conține soluția de substrat (o peptidă).

Se observă că chiar după 6 zile (timp în care enzima solubilă se deteriorează) suspensia de enzimă imobilizată își păstrează intactă activitatea.

Metoda imobilizării enzimelor pe membrane de „Hollow-fiber” prezintă avantajul fixării unor sisteme multienzimatice ca și a cofactorilor respectivi, fibrele reținând enzimele dar fiind permeabile pentru coenzime.

Totuși, spre deosebire de alte procedee de imobilizare această metodă are aplicabilitate mai restrânsă, imobilizarea enzimelor ca și stabilitatea preparatelor obținute fiind dependente de un număr mare de factori, care au fost enumerați mai sus.

Acolo unde poate fi aplicată, metoda se pretează ușor la industrializare și la construcția unor reactoare folosite în industria alimentară și cea farmaceutică.

I. 2. Metode chimice de imobilizare a enzimelor (prin formare de legături covalente)

Legarea covalentă a unei enzime pe o suprafață solidă reduce posibilitatea desprinderii proteinei de pe suport în timpul utilizării aductului.

Insolubilizarea pe cale chimică a enzimelor poate fi realizată prin: fixarea covalentă pe un suport solid insolubil, printr-o legare chimică simultană cu formarea suportului solid, sau printr-o agregare (reticulare) a enzimei (chiar și în lipsa unui suport) cu agenți difuncționali. Imobilizarea chimică (spre deosebire de metodele fizice) este ireversibilă.

Metoda covalentă de imobilizare a enzimelor este bazată pe formarea de legături covalente între molecula enzimei și suport.

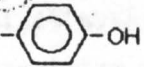
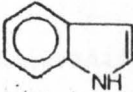
În comparație cu metodele fizice de imobilizare, cele chimice sunt mai complicate, necesitând în general mai multe etape. În aducții obținute enzima este atât de puternic legată, încât nu poate fi desprinsă nici chiar în prezența unor substraturi sau a unor soluții cu tărie ionică înaltă. Este foarte important ca metoda de imobilizare să nu afecteze mult aminoacizii esențiali care conferă enzimei activitatea biocatalitică. Acest lucru este destul de greu de realizat practic, ceea ce explică scăderea activității enzimei după cuplarea covalentă cu suportul. De aceea se preferă uneori imobilizarea enzimei în prezența substratului sau a unui inhibitor competitiv.

Metoda chimică de imobilizare are o aplicabilitate mai mare decât cea fizică, datorită multiplelor posibilități de reacție dintre grupele reactive libere din lanțurile proteinelor și grupele active de pe suprafața suporturilor. În tabelul Nr. 11 sunt indicate grupele funcționale reactive ce se pot afla grefate pe

moleculele de proteine.

Tabelul Nr. 11

Grupe reactive din proteine (după Srere și Uyeda, 1976)

Gruparea	Restul din care provine
$-NH_2$	ϵ -amino din L-lisina (L-Lys) și grupa $-NH_2$ terminală
$-SH$	Tiol din L-cisteina (L-Cys)
$-COOH$	Grupa carboxil a acizilor: L-aspartic (L-Asp) și L-glutamic (L-Glu) și grupa $-COOH$ terminală
	Grupa fenolică din L-tirosina (L-Tyr)
$-NH-C(=NH)-NH_2$	Grupa guanidino din L-arginina (L-Arg)
	Restul imidazolic din L-histidina (L-His)
$-S-S-$	Grupa disulfura din L-cistina
	Restul de indol din L-triptofan (L-Trp)

Tabelul Nr.11 (continuare)

Gruparea	Restul din care provine
$\text{CH}_3\text{-S-}$	Restul tioeter din L-metionină (L-Met)
$\text{-CH}_2\text{OH}$	Gruparea hidroximetilen din L-serină (L-Ser) și L-treonină (L-Thr)

Din tabelul Nr. 11 lipsesc aminoacizii cu grupări amidice ca și glicina, datorită concentrației lor scăzute în proteinele care se imobilizează ca și datorită lanțurilor lor hidrocarbonate cu caracter hidrofob. În tabelul Nr. 12 se indică compoziția procentuală în aminoacizi a unor proteine, din punctul de vedere a reactivității relative a acestora.

Tabelul Nr. 12

Compoziția în aminoacizi a resturilor reactive ale
moleculelor preteinelor

Restul reactiv al moleculei proteinei	Conținut (%)
Ser	7,8
Lys	7,0
Thr	6,5
Asp	4,8
Glu	4,8
Arg	3,8
Tyr	3,4
Cys	3,4
His	2,2
Met	1,6
Trp	1,2

În 1971, Means și Feeny au făcut o comparație interesantă între un număr de reacții în care poate participa fiecare aminoacid din lanțul proteinei (tabelul Nr.13).

Tabelul Nr. 13

Numărul de reacții la care poate participa fiecare aminoacid din lanțul proteinelor

Restul de:	Număr de reacții
Cys	31
Lys	27
Tyr	16
His	13
Met	7
Trp	7
Arg	6
Glu	4
Asp	4
Ser	0
Thr	0

Din tabelele 12 și 13 se poate trage concluzia că resturile de aminoacizi cele mai convenabile pentru imobilizare sunt:

L-lizil > L-cisteinil > L-tirozil > L-histidinil > L-aspartil > L-glutamil > L-arginil > L-triptofanil > L-seril > L-treonil > L-metionil.

Cuplarea moleculelor de enzimă pe suport reclamă condiții blânde de reacție între resturile de aminoacizi din enzimă (indicate mai sus) și grupele reactive ale suporturilor.

Modul cel mai simplu de cuplare ar fi amestecarea unei soluții (suspensii) de enzimă cu suportul. Din păcate numai un număr redus de suporturi conțin grupe reactive capabile de a reacționa direct cu enzima. Majoritatea suporturilor **uzuale** nu conțin însă aceste grupări reactive, dar au de obicei grupe: hidroxil, amino, amido, carboxil etc., care se pot activa pentru a le face capabile de a reacționa cu enzima.

Diverse ~~procedee~~ de activare a suporturilor ca și modul de cuplare cu acestea a enzimelor, fac ca metodele de imobilizare chimică să fie clasificate în patru categorii (pag. 5), care vor fi descrise în cele ce urmează.

..I.2.1. Fixarea enzimelor pe suporturi insolubile

În esență, această primă (ca și cea mai răspândită) metodă de imobilizare chimică constă în reacția dintre enzimă și suport, cu formare de noi legături covalente.

Factorii care influențează activitatea reziduală a enzimelor astfel imobilizate sunt în principal următorii:

a) Compatibilitatea dintre conformația enzimei și substrat

Pentru ca preparatul enzimatic obținut să fie activ, este necesar ca situsul reactiv al enzimei să rămână accesibil mediului cu care va veni în contact, să nu pătrundă în porii suportului și să nu fie blocat de către grupările vecine de pe suprafața suportului.

Spre deosebire de metodele fizice de imobilizare, în majoritatea cazurilor de legare covalentă se observă o restrângere a mobilității conformaționale a enzimei.

În 1973, Roger și Uy au arătat că enzima poate fi fixată cu păstrarea conformației active, dacă imobilizarea se face în prezența substratului.

b) Alt factor este posibilitatea alterării chimice a enzimelor în cursul legării covalente, ceea ce provoacă o reducere a activității enzimatică, ca rezultat al blocării situsului reactiv.

Metodele de imobilizare folosite trebuie să ducă la restrângerea acestor posibilități. În timp, s-au pus la punct o mare varietate de metode de imobilizare care exclud inactivarea enzimelor. De exemplu, dacă situsul reactiv al enzimei conține o grupă NH_2 , se va adopta o schemă de imobilizare care să nu implice reacții la această grupare.

Condiții de lucru ca: pH, tărie ionică, temperatură etc., se aleg astfel încât să reducă la minim riscul scăderii activității enzimei.

Imobilizarea enzimei în prezența substratului sau a unor inhibitori, conservă reactivitatea acesteia.

c) Factorii economici au și ei un rol determinant în alegerea metodei de imobilizare.

Economicitatea procedurii se apreciază în funcție de: reactivitatea remanentă a enzimei din aductul obținut, simplitatea reacției de imobilizare, costul suportului și reactivilor utilizați.

Ca suporturi insolubile se folosesc mai ales materiale solide (organice sau anorganice) cu o suprafață mare, sub formă de particule foarte mici, de obicei sferice și foarte poroase.

I.2.1.1. Suportul

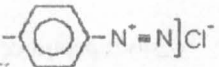
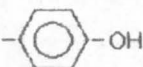
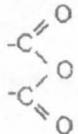
Legarea covalentă a enzimelor include reacția unei grupe funcționale de pe suprafața fazei solide (a suportului) cu o grupare reactivă conținută de enzimă.

Cum enzimele sunt polipeptide compuse dintr-o mare varietate de aminoacizi, pot fi folosite grupările funcționale libere din resturile acestora (tabelul Nr. 11).

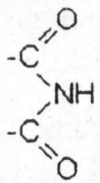
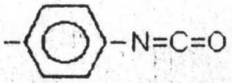
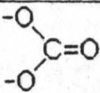
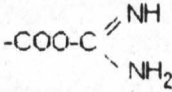
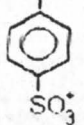
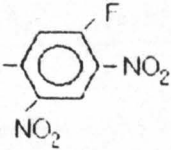
În tabelul Nr. 14 sunt sumarizate principalele tipuri de reacții ce pot avea loc între grupările reactive din lanțurile proteinice și grupările reactive de pe suprafața suporturilor preactivate.

Tabelul Nr. 14

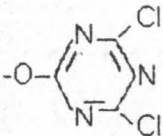
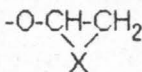
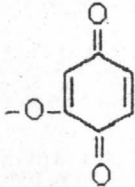
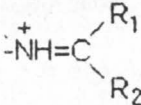
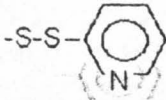
Metode de imobilizare chimică a enzimelor, cu formare de legături covalente cu suportul

Grupe reactive ale suportului	Grupe reactive ale enzimei	Reacția de cuplare cu formare de:
1	2	3
 Saruri de diazoniu	-NH ₂ -SH 	Legături diazo
 Anhidride	-NH ₂	Legături peptidice
-CO ₂ -CON ₃ Acil-azide	-NH ₂ -SH -OH	Legături peptidice

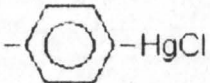
Tabelul Nr. 14 (continuare)

1	2	3
 Imide	-NH ₂	Legaturi peptidice
R-N=C=O Alchilizocianati  Arilizocianati	-NH ₂	Legaturi peptidice
-CH₂COCl Cloruri de acil	-NH ₂	Legaturi peptidice
 Carbonati	-NH ₂	Legaturi peptidice
 O-aciluree	-NH ₂	Legaturi peptidice
-COO-C=CHCONHC₂H₅  Reactiv Woodward	-NH ₂	Legaturi peptidice
 2,4-dinitrofluorobenzen	-NH ₂	Arilare

Tabelul Nr. 14 (continuare)

1	2	3
 Grupe triazinil	-NH ₂	Arilare
 X = NH, O, S oxirani; aziridine etc.	-OH -SH -NH ₂	Alchilare
-O-CH₂-CH₂-SO₂-CH=CH₂ Alcoxivinil-sulfone	-NH ₂ -SH -OH	Alchilsulfonare
 Grupe cetovinilice ~~ciclohex~~	-NH ₂ -SH -OH	Cetovinilare
-CHO	-NH ₂	Baze Schiff
-CN	-NH ₂	Reactii de amidinare
 Grupe imino protonate	-COOH -NH ₂	Reactia Ugi
 Resturi disulfurice	-SH	Reactii de schimb tiol-disulfura

Tabelul Nr. 14 (continuare)

1	2	3
 Saruri de mercur	-SH	Legaturi enzima-mercur
M• Radicali liberi ai suportului	E• Radicali liberi ai enzimei	Reactii induse prin iradiieri γ
-NH ₂ Amine	-OH -COOH	Legaturi peptidice (in prezenta agentilor de condensare)
-CO-NH-NH ₂ Acilhidrazide	-NH ₂ -COOH	Legaturi peptidice (in prezenta agentilor de condensare)

Suportul (faza solida) poate prezenta o mare varietate de proprietati fizice si chimice.

Un bun suport trebuie să aibă o rezistență mecanică și stabilitate de durată. Suporturile care răspund cel mai bine acestor exigențe sunt polimerii naturali și sintetici, metale și oxizi metalici (tabelul Nr. 15).

Tabelul Nr. 15

Exemple de suporturi pentru imobilizarea covalentă a enzimelor

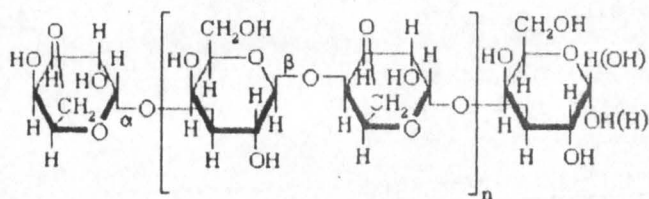
Polimeri sintetici	Polimeri naturali	Materiale anorganice
Poli(etilen-maleinonhidridă)	Celuloză și derivați	Perle de sticlă silicică
Poliacrilamide	Agaroză și derivați	Metale (oțeluri, Ti, Zn)
Polistiren și derivați	Amidon și derivați	Oxizi metalici (NiO, Al_2O_3)
Poli(aminoacizi)	Derivați de Dextran	Materiale ceramice
Nylon	și Sephadex	Bentonită
Gauciuc siliconic		Magnetită

Cel mai des folosite dintre suporturi sunt următoarele:

- Celuloza activată cu BrCN sau sub formă de carboximetil-celuloză (CMC)
- Sepharoza este un gel de agaroză, agaroză fiind un polimer linear format din resturi de D-galactoză și 3,6-anhidro-D-galactoză (fig. nr.10)

Fig. nr. 10

Structura macromoleculelor de agaroză



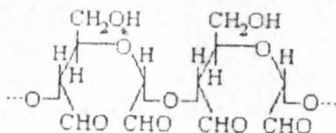
- Sephadexul este un dextran polimerizat (reticulat) de obicei sub formă de perle. În general, fixarea enzimelor pe suporturi de polizaharide necesită o activare prealabilă a suportului prin introducerea pe suprafața acestuia a unor grupări reactive.

- Enzacryl reprezintă granule (perle) de poliacrilamide care conțin grupări funcționale reactive (fenilamino, hidrazil, tiol etc.).

- Copolimer de etilenă și anhidridă maleică, care reacționează direct cu grupele nucleofile din enzime.

- Polistirenul și poliaminostirenul activați chimic. Activarea suporturilor se face atât cu reactivi organici cât și anorganici. Astfel, săruri ca: $TiCl_4$, $SnCl_4$, $SnCl_2$, $SnCl_2 \cdot 2H_2O$, $VOCl_3$, $FeCl_3$ se folosesc la tratarea suprafețelor unor suporturi ca: sticle borosilicioase, sticle sodice, hârtie de filtru, celuloză, nylon, pentru activarea acestora.

- Amidonul dialdehidic (amidon oxidat cu HIO_4) conține câte două grupări CHO per rest glicozidic:



- Rășini fenolice de tip fenol-formaldehidic bazate pe:

fenol, rezorcină, pirocatechină, fluoroglucină, ortocrezol.

Aceste rășini modificate chimic pentru activare pot fi folosite și sub formă de perle, în reactoare de tip coloană.

- Sticlele de diferite tipuri trebuie să fie poroase. Suprafața sticlei se activează de asemenea chimic pentru a putea reacționa cu enzimele.

I.2.1.2. Tehnici de cuplare a enzimelor pe suporturi solide

Cuplarea covalentă pe un suport insolubil implică trei etape principale:

1°. Activarea suportului pentru a putea reacționa cu grupările funcționale libere ale proteinei.

2°. Activarea moleculei de proteină pentru cuplarea pe suport.

3°. Legarea cu suportul în prezența unui agent de cuplare.

A. Condiții de cuplare

În timpul cuplării covalente este necesară păstrarea conformației active a enzimei.

Conformația primară este determinată de secvența aminoacizilor din lanțul peptidic.

Legăturile în urma cărora se formează conformațiile secundară, terțiară și cuaternară sunt (cu excepția legăturilor disulfurice) de tip necovalent (legături saline, de hidrogen etc.)

Aceste legături sunt relativ labile, însumarea lor determinând stabilitatea structurală a proteinei.

Natura fragilă a acestor legături necovalente restrânge condițiile în care o proteină își poate menține conformația activă (temperatura $< 35^{\circ}\text{C}$, pH acid mai mare de 3 sau 4, pH bazic mai mare de 9 sau 10).

Există și excepții, unele proteine putând fi denaturate reversibil.

Majoritatea condițiilor de denaturare sunt relativ blânde în termeni chimici (pH=3, uree 6 M, clorură de guanidiniu 6 M).

Condiții mai drastice sunt necesare pentru scindarea legăturii peptidice sau pentru oxidarea grupelor SH, structura proteinei modificându-se ireversibil,

Grupări funcționale ale proteinelor accesibile legării covalente

În tabelul nr.11 sunt indicate principalele grupări reactive din lanțurile proteinelor..

Posibilitatea ca aceste grupe să poată participa la legarea covalentă pe suport depinde de:

- concentrația relativă a aminoacizilor corespunzători în molecula proteinelor;
- natura hidrofobă a resturilor de aminoacizi. O hidrofobitate crescută a acestora poate duce la creșterea posibilității ca restul de aminoacid să rămână „cufundat” în interiorul proteinei (și deci mai puțin disponibil pentru reacția cu suportul).

Reactivitatea resturilor de aminoacizi permite clasificarea pe tipuri de reacții (tabelul nr. 14). Majoritatea grupărilor reactive au caracter nucleofil ($-\text{NH}_2$, $-\text{SH}$, $-\text{OH}$). Anionul $-\text{S}^-$ are o nucleofilicitate de două ori mai mare decât grupările $-\text{NH}_2$ și $-\text{S}$ (care sunt comparabile ca bazicitate).

Studiindu-se concentrația relativă, hidrofobicitatea și reactivitatea resturilor de aminoacizi, s-a observat că resturile cele mai propice pentru cuplare sunt cele de Lys, urmate în ordine de: Cys, Tyr, His (Asp, Glu), Arg, Trp (Ser, Thr) și Met.

B. Problema centrilor activi ai enzimei

Conform celor arătate mai înainte, reactivitatea grupărilor din proteine depinde de poziția resturilor de aminoacizi și de vecinătatea în care acestea sunt plasate.

Dacă proteina prezintă molecule mai voluminoase, schimburi-le pe centrii activi vor fi parțial împiedicate și deci centrii activi vor fi relativ inerți, în timp ce restul moleculei ce este expus acțiunii solventului va fi mai reactiv.

Se știe că resturile de aminoacizi de pe centrii activi au proprietăți și reactivități caracteristice, speciale. Toate tipurile de structuri ale proteinei și deci și secvența primară determină reactivitatea situsului enzimatic, atât prin aranjamentul tridimensional cât și prin microvecinătatea restului de enzimă aflat în apropierea situsului. Prezența unor grupări ionizabile la centrul activ determină la acesta valori pK diferite de restul moleculei (chiar dacă în restul moleculei se găsesc prezente aceleași grupări).

Dacă situsul activ este pe suprafața proteinei, probabilitatea unei reacții depinde de raportul dintre aria centrului activ și suprafața totală a proteinei.

Dacă reacția de cuplare cu suportul este avansată, angajând majoritatea grupelor reactive, agregatul obținut nu va fi **activ**.

Situsul activ al enzimei este în mod frecvent în partea interioară a structurii proteinei. Accesul la centrul activ și

la grupările acestuia depinde de dimensiunea, stereochemia și sarcinile caracteristice ale reactivului. În cazul unei grupe imobilizate pe un suport solid, geometria aranjamentului obținut poate fi un factor important în menținerea centrului reactiv nemodificat în urma cuplării. Este posibil ca în urma cuplării să se modifice situsul reactiv și să scadă activitatea enzimei. Adăugând substratul sau un inhibitor competitiv la amestecul de reacție se poate proteja perfect situsul activ al enzimei.

C. Determinarea grupărilor angajate în cuplare

În majoritatea cazurilor nu este necesar să se cunoască exact ce grupări anume din proteină sunt implicate în legăturile covalente.

Dacă prin cuplarea cu suportul nu este posibil să se recupereze cantitativ activitatea inițială a enzimei, trebuie să existe asigurarea că situsul activ s-a menținut intact în urma cuplării. Totuși, este important să se cunoască ce fel de legături s-au format între proteină și suport în cursul imobilizării și dacă centrii activi s-au păstrat și în ce măsură.

Această problemă poate fi rezolvată printr-un număr mic de determinări. Astfel, pentru a determina grupările din proteină se pot folosi:

- metoda hidrolizei totale cu HCl urmată de analiza aminoacizilor înainte și după imobilizarea proteinei. Diferența observată dă seama asupra restului enzimei implicat în legarea covalentă cu suportul. Metoda are dezavantajul că în cursul hidrolizei acide se pot rupe și legăturile covalente cu suportul.

- Altă metodă de determinare a resturilor de aminoacizi implicați în legătura covalentă utilizează reacții specifice de identificare pentru fiecare asemenea aminoacid.

Astfel, resturile de cisteină (cisteinil) se pot doza ușor cu dinitrobenzoat, determinând grupările SH înainte și după cuplare. Diferența dintre aceste valori indică numărul de resturi cisteinil angajate în imobilizarea covalentă.

D. Suporturi activate chimic

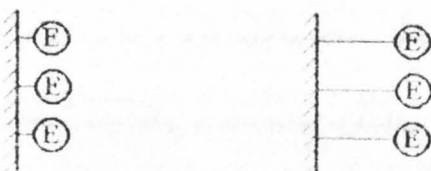
În majoritatea cazurilor, cuplarea covalentă a enzimei cu suportul este precedată de activarea prealabilă a suportului, care urmărește două scopuri esențiale:

- Cel mai important este legat de introducerea în molecula suportului a unor grupări funcționale reactive față de grupările funcționale libere din molecula enzimei.

- Alt scop urmărit în activarea suportului este introducerea (simultană sau succesivă) odată cu gruparea reactivă a unui braț („spacer”) alungit pe molecula suportului, pentru a cupla enzima la distanță de aceasta (fig. nr.11). În acest fel se evită dezactivarea situsului activ al enzimei prin efecte de microvecinătate (sterice, electrice etc.) ale restului moleculei de suport.

Fig. nr. 11

Imobilizarea covalentă a unei enzime (E) fără „spacer” (a) și prin intermediul unui „spacer” (b)



O clasificare generală a metodelor de activare a suporturilor pentru legarea covalentă a enzimelor poate fi făcută atât după tipurile de reacții folosite în acest scop, cât și după natura suportului. Acest din urmă criteriu este mai avantajos, dat fiindcă pentru fiecare suport în parte, în funcție de natura grupărilor funcționale pe care le conține acesta, se aleg reactivi specifici de activare.

I.2.1.3. Imobilizarea enzimelor pe suporturi de polizaharide

Cele mai importante polizaharide utilizate ca suport sunt: celuloza, dextranul, amidonul, agarul, agaroză și Sephadexul.

Din punct de vedere economic, celuloza și amidonul sunt cele mai atractive materiale pentru imobilizare.

Aceste suporturi cu structură bine cunoscută au dezavantaje ca: textură macroporoasă (improprie imobilizării enzimelor în stare granulară) și susceptibilitate la degradări microbiene.

Sephadexul este un dextran sub formă reticulată, superioară din unele puncte de vedere celulozei și amidonului. Enzimele fixate pe Sephadex prezintă o activitate relativă superioară agregatelor de tip enzimă-celuloză.

Sephadexul sub formă de gel are de asemenea și o influență de microvecinătate (distructivă pentru enzimă) mult mai redusă decât fibrele de celuloză cu regiunile lor de microcristalite.

Amidonul este mai ușor atacat de microorganisme decât Sephadexul.

Gelurile de agar și agaroză sub formă de perle sunt suporturi ideale pentru legarea enzimelor.

1°. Agar și agaroză

Agaroza este un agar scindat, de densitate mică care ca și agarul formează geluri rigide, dacă soluțiile acestor poligalactani se răcesc sub -45°C . Rigiditatea nu este influențată sensibil de variația timpului de răcire sau de prezența unor substanțe care de obicei duc la creșterea rigidității.

Solubilitatea maximă a agarului în apă este de 6-10%. Se pot prepara și geluri granulate de densitate mai înaltă, dacă, de exemplu, agarul granulat se dispersează în apă și se liofilizează sau se usucă în vacuum, după care apa este înlocuită cu CH_3OH sau $\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$; apoi se tratează cu un agent de reticulare. Creșterea densității poate duce însă la descreșterea elasticității perlelor de agar.

Gelurile de agar și agaroză diferă de gelurile bazate pe dextran reticulat, alcool polivinilic sau poliacrilamidă prin capacitatea lor de a-și menține un volum constant dacă apa este schimbată cu solvenți cu polaritate mai scăzută.

Agarul (gel) are și o permeabilitate favorabilă raportată la densitatea mică a suportului. Totuși gelurile cu o concentrație de 6-10% se utilizează pentru enzime cu masă moleculară moderată ($< 100,000$) și pentru substraturi, cu masă moleculară mică.

Densitatea scăzută este favorabilă formării complexului enzimă-substrat într-un interval larg de dimensiuni moleculare.

Agarul este foarte stabil în soluții apoase la $\text{pH} \sim 3$. În prezența unor reducători sau în absența oxigenului, gelurile de agar reticulate cu epichelohidrină și supuse acțiunii NaOH 10-30% la 120°C , se distrug. Agarul este mai puțin stabil în mediu acid puternic, dar poate fi tratat cu HCl 1 M sau cu CH_3COOH 50% perioade scurte de timp.

Reticularea agarului sau agarozei face să le crească stabilitatea la acțiunea acizilor, ca și termostabilitatea. Se obțin suporturi insolubile la cald.

În ceea ce privește rezistența biologică, polizaharidele de tip agar și agaroză sunt rezistente la atacul bacterian. Enzimele care degradează agaroză (agarazele) nu se găsesc decât în unele microorganisme din algele marine.

Reticularea agarului îl face practic inatacabil față de aceste microorganisme.

Gelurile de agar influențează puțin funcția catalitică a enzimei imobilizate, în comparație cu alte suporturi.

Pe suporturile de densitate mare, enzimele se imobilizează exclusiv în stratul de pe suprafață al particulelor de polizaharid, ceea ce nu le face atractive pentru aplicații industriale (rețin o cantitate mică de enzimă). Gelurile cu densitate mică au însă o rezistență mecanică scăzută.

Agarul brut este puțin utilizat. În scopuri analitice el este prelucrat, preparându-se agaroză de înaltă puritate. Pentru scopuri industriale nu este necesară o purificare avansată.

Agaroză se obține prin extracția alcalină a agarului.

Metoda generală de perlare a agarozei constă în dispersarea unei soluții apoase de agaroză într-un solvent organic (toluen) în prezența unui stabilizator de emulsii apă în ulei, la 50°C. Prin răcirea emulsiei la temperatura camerei se obține gelul perlat de agaroză care se decantează și se spală cu apă distilată. Perlele se sortează prin cernere pe site cu ochiuri de diferite mărimi.

Gelurile perlate de agaroză se păstrează în apă distilată și poartă denumirea de Sepharoză, de concentrații diferite:

- Sepharoză 6 B (6%);
- Sepharoză 4 B (4%) etc.

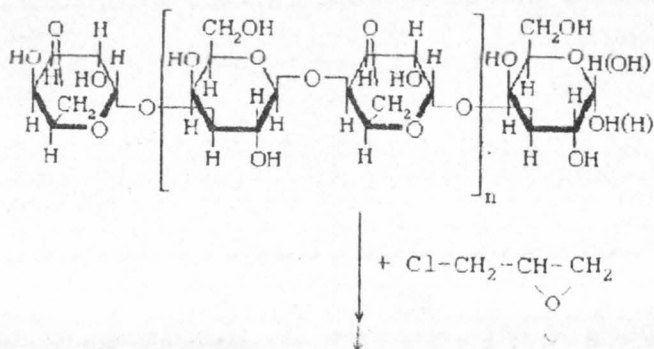
Etapă următoare este reticularea agarozei, care duce la creșterea stabilității mecanice și termice a gelului.

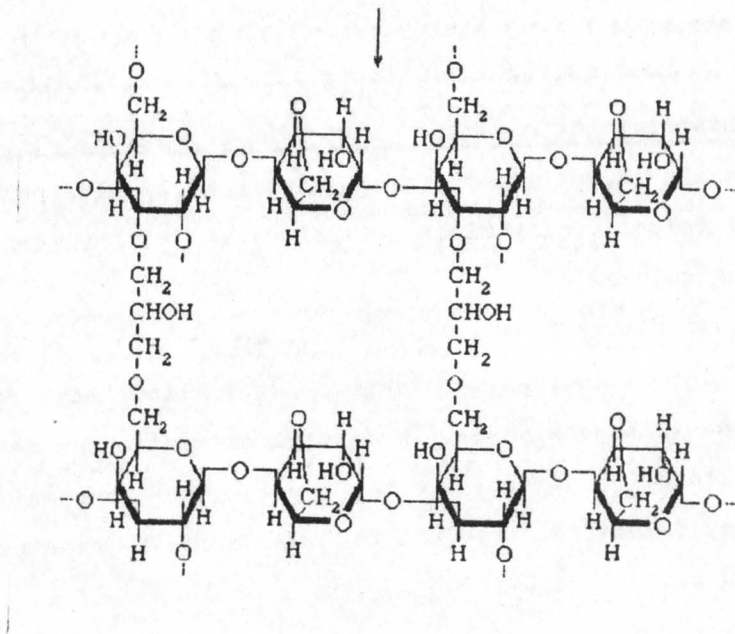
Metoda uzuală, utilizată este aplicată și la alți polimeri hidroxilici (alcool polivinilic) și folosește epiclорhidrina ca agent de reticulare.

Prin reticularea cu epiclорhidrină, moleculele filiforme de polimer hidroxilic sunt legate prin punți glicidice, obținându-se o rețea tridimensională. În funcție de cantitatea de epiclорhidrină folosită se obține o rețea mai strânsă sau mai laxă.

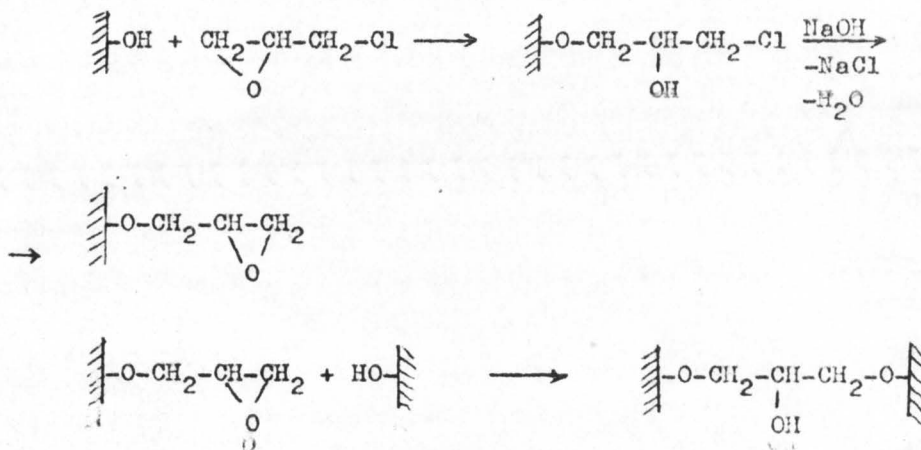
Agaroza, formată din resturi de 3,6-anhidro-L-galactoză alterând cu resturi de D-galactoză, va reacționa astfel: (fig. nr. 12).

Fig. nr. 12





Schema generală a reticulării unui polimer polihidroxilic va fi deci următoarea:



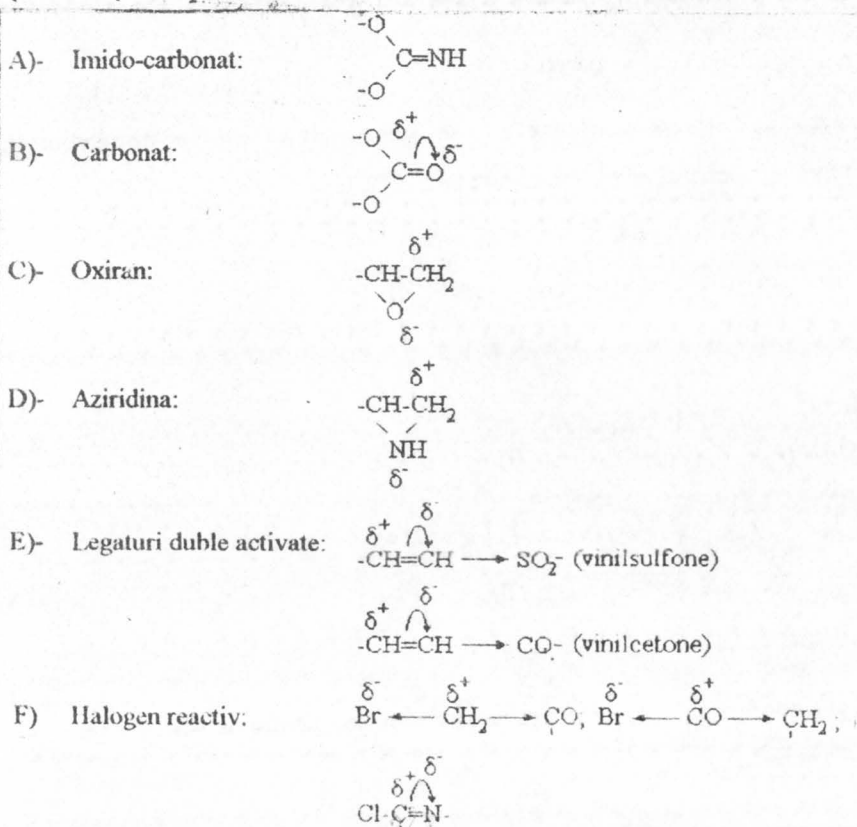
Polizaharidul astfel reticulat, având o structură

tridimensională și o rezistență crescută, reprezintă suportul insolubil pentru imobilizarea covalentă a enzimelor.

Pentru a mări reactivitatea gelului față de grupările nucleofile existente în enzime ($-\text{NH}_2$, $-\text{OH}$, $-\text{SH}$, $-\text{COOH}$, resturi aromatice și heteroaromatice) se activează suportul prin introducerea unor grupări reactive, electrophile.

Activarea gelului de polizaharid reticulat

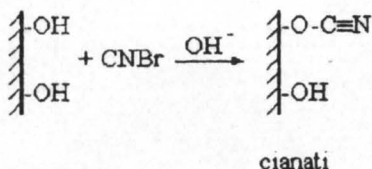
Cele mai uzuale grupări electrophile introduse pe un gel (suport) de polimer hidroxicilic sunt:



A) Gruparea imido-carbonat

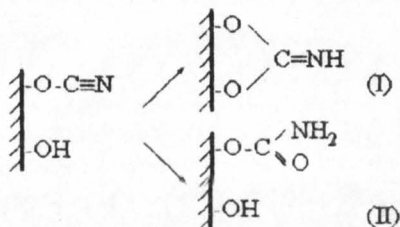
Metoda cea mai utilizată este bazată pe reacția dintre BrCN sau ClCN și grupele -OH ale polizaharidului-suport, în mediu alcalin apos sau în amestec apă + solvent (organic).

Se lucrează la temperatura camerei, la un pH optim de 11-12,5:

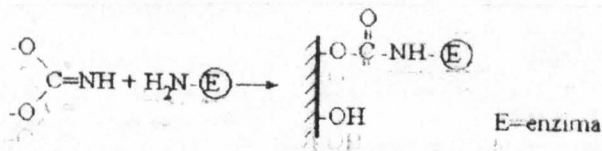


Cianații, foarte instabili, se transformă în imidocarbonați

(I) reactivi și carbamați nereactivi (II):

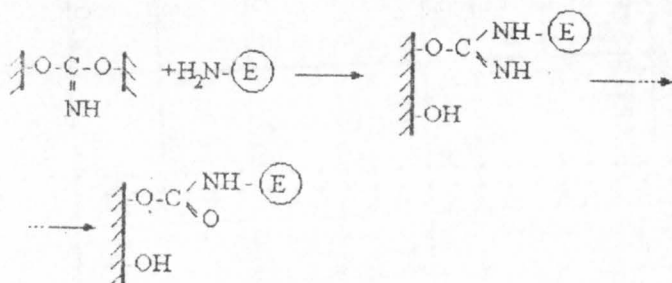
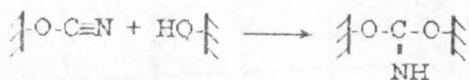


Imidocarbonatul (I) reacționează cu o grupare -NH₂ din molecula enzimei:



Cuplarea enzimei are loc prin intermediul grupelor NH_2 libere din poziția ϵ a lisinei și din gruparea NH_2 terminală a lanțului polipeptidic al enzimei.

O mică parte din imido-carbonat suferă o reticulare, prin intermediul grupei cianat:



Proprietățile produsului final depind de condițiile din etapa de cuplare și de modificările ce pot apare ulterior, în timpul stocării.

Este o metodă folosită mult pentru imobilizarea chimotripsinei pe Sepharoză și Sephadex (tabelul nr. 16).

Din tabelul nr.16 se poate observa deosebirea dintre comportarea chimotripsinei solubilizate și cea imobilizată, la diverse valori de pH. Gelul de Sephadex este permeabil la atacul dextranazei care scindează legăturile glicozidice și-l lichefiază, solubilizarea fiind însoțită de creșterea activității enzimatică. Acest efect este maxim la $\text{pH}=9,8$, parametrii catalitici apropiindu-se de cei ai enzimei libere.

În cazul imobilizării, situsul catalitic rămâne evident

Tabelul Nr. 16

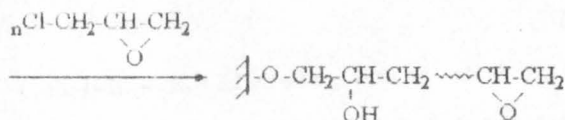
Proprietățile unor aducți de chimotripsină imobilizată pe dextrani
activați cu BrCN

Aductul	pH-ul activării cu BrCN	Timpul digestiei dextranoli- tice	Esterul etilic al N-acetil-L-tirosinei				Caseină (% acti- vitate față de enzima liberă)
			pH optim	Activitate (μ mol/min. per mg enzimă)	K_M (mM)	V_{max} . (μ mol/min per mg enzimă)	
Chimotripsină (ChTr) liberă	-	-	7,8	230	3,3	280	100
ChTr imobilizată pe Sephadex G-200 I	10,3	-	9,8	60	25-30	160-80	15
ChTr solubilă - Sephadex G-200 I	10,3	60	8,3	140	5	190	60
ChTr imobilizată pe Sephadex G-200 II	9,8	-	9,8	80	30-40	250-90	35
ChTr solubilă - Sephadex G-200 II	9,8	6	7,8	230	3	280	100

intact. Diferențele dintre proprietățile enzimei cuplată pe gelul activat la diferite pH-uri sunt evidente. La pH=10,3 situsul activ poate fi distrus, dezactivarea în acest caz datorându-se împiedicărilor sterice.

B) Oxirani

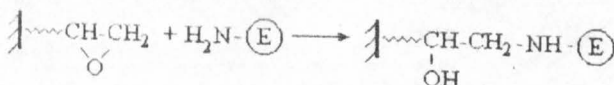
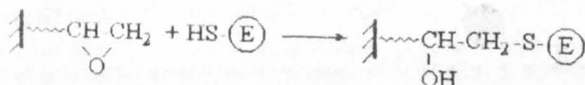
Grupa oxiran. poate fi introdusă în majoritatea polimerilor hidroxilici cu ajutorul Halohidrinelor:

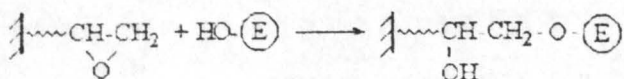


(reticularea)

În acest caz reticularea și activarea gelului au loc într-o singură etapă, obținându-se un suport insolubil în apă la fierbere și ceva mai stabil în mediu acid:

Reactivitatea unui asemenea suport activat față de grupările nucleofile ale proteinei variază în ordinea: -SH > -NH > -OH:

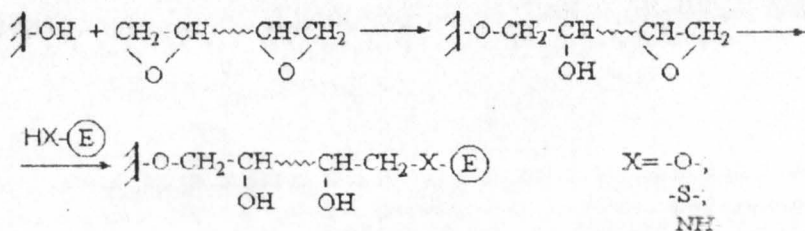




Atacul nucleofil al grupării-OH decurge la pH mai alcalin (~ 11) decât atacul-NH₂, iar acesta la rândul său, la o alcalinitate mai mare decât în cazul grupei -SH. Gruparea -OH fenolică din resturile de tirozil ocupă o poziție intermediară între -OH alcoolic și -NH₂.

Metoda oxiraniilor se recomandă pentru enzime suficient de reactive și stabile și este avantajoasă față de metoda cuplării cu imido-carbonat pentru că legăturile: O-C, N-C și S-C formate sunt extrem de stabile.

Utilizând bisoxirani de forma generală: $\text{CH}_2\text{-CH}(\text{O})\text{-(CH}_2)_n\text{-CH}(\text{O})\text{-CH}_2$ ca 1,4-n-butandiol-diglicidileter ($n=0$) se introduce un „spacer” mai lung:



Acest „spacer” separă suficient de bine enzima de suport, pentru a păstra activitatea acesteia.

Reacția de imobilizare a enzimei nu trebuie să afecteze centrul reactiv al biocatalizatorului.

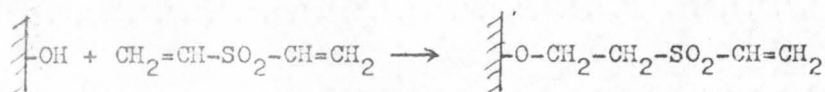
Metoda este folosită mai ales pentru chimotripsină.

E) Duble legături activate

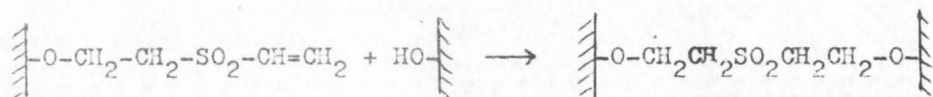
a. Divinil-sulfone

Grupele vinil-sulfonil se pot introduce într-un polimer

hidroxilic prin tratare cu divinil-sulfonă în mediu alcalin:

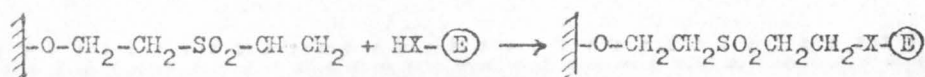


Are loc simultan și o reticulare (reactivul fiind difuncțional):



Reticularea conduce la un suport cu calități superioare pentru imobilizarea enzimelor. Viteza atacului nucleofil al enzimelor variază în ordinea de la oxirani: $-\text{SH} > -\text{NH}_2 > -\text{OH}$, dar reacția are loc la o unitate de pH mai jos.

Cuplarea enzimei are loc astfel:



$\text{X} = -\text{S-}; -\text{NH}; -\text{O-}$

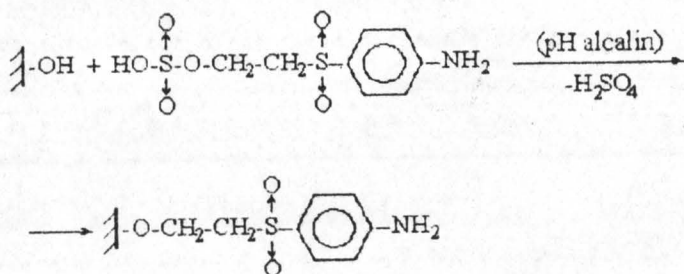
Legăturile C-N formate prin cuplarea cu grupările NH_2 ale enzimei sunt mai stabile.

La pH ~ 8 se observă o tendință de desprindere a liganzilor (enzimelor) cu masă moleculară scăzută.

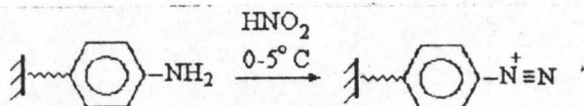
Metoda este alternativă la cuplarea cu oxirani.

O variantă a activării cu sulfone a agarozei, a fost aplicată în 1981 de Juan și colaboratorii, care au imobilizat fosfoglucomutaza (PGM); procedeul implică mai multe etape:

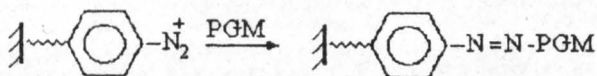
- reacția cu sulfatul β -hidroxietil-p-aminofenil-sulfonei (esterificare):



- diazotare:



- cuplare cu PGM:



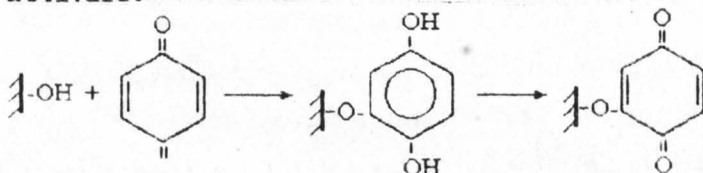
Activitatea remanentă a enzimei din aduct este de $\sim 64\%$, iar stabilitatea sa termică este mai mare decât cea a enzimei libere.

b. Vinilcetone

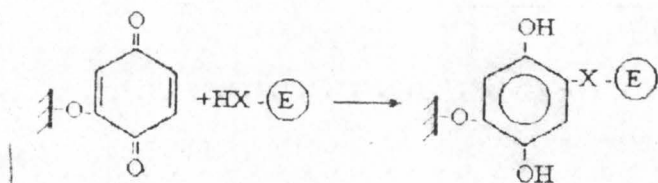
Agaroza reticulată cu o divinilcetone conduce la un produs insolubil la cald.

Cele mai reactive sunt chinonele (mai reactive decât divinil-sulfonele). Etapele imobilizării sunt:

- Activare:



- Cuplare:



X = -S-; -O-; -NH-

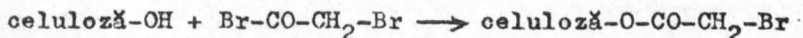
Metoda este simplă și conduce la randamente înalte de cuplare, putând fi folosită într-un interval larg de pH (3-10) pentru serum albumină.

Reacția se utilizează pentru imobilizarea serum albuminei pe Sepharoză 4B și Sephadex. Se poate folosi Sepharoză reticulată sau nereticulată.

F) Halogen activat

Halogenii activați (prin vecinătatea unui substituent cu efect -I) pot fi introduși într-un polimer hidroxilic pentru a ușura cuplarea enzimei.

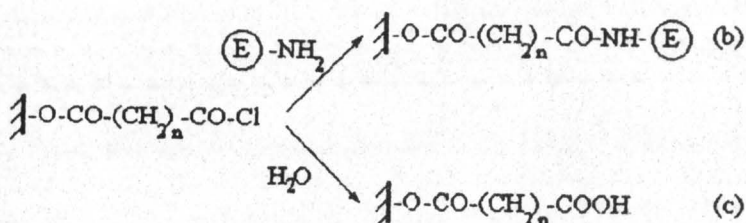
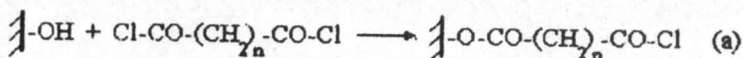
Prima reacție a fost transformarea celulozei în bromacetatul său:



Halogenii pot fi activați și de alte grupări vecine, ca: -OH din halohidrine (HO-CH₂-CH₂-Br).

Legătura formată cu suportul prin tratare cu bromacetat nu este foarte stabilă. De aceea se preferă o preactivare cu dihalo-cetone a suportului și abea după aceea tratarea cu bromura acidu-ului bromacetic.

Se pot folosi și clorurile acizilor dibazici, care fiind agenți difuncționali permit să se obțină geluri rigide de agar după schema:



Reacția (a) se conduce într-un solvent aprotic cu catalizator (o amină tețiară).

Se transferă apoi gelul într-un amestec solvent-apă dar metoda este îngreunată de reacția secundară (c) care concurează reacția (b).

Utilizând diolul acidului glutaric se obține un gel de agar foarte rigid datorită unei reticulări simultane.

G) Cuplarea prin iradiere

Brandt și Andersson au cuplat enzime pe agaroză și dextran prin iradierea cu raze γ a unor suspensii de geluri conținând proteine. În proteină se formează radicali liberi, care se fixează pe gel prin interacția de tip radical-radical:



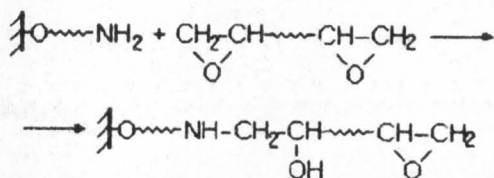
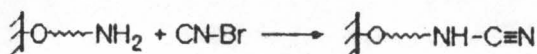
Metoda nu este selectivă. Avantajul este insensibilitatea sa la acțiunea pH-ului și temperaturii, dar prezintă dezavantaje legate de randamentul scăzut de cuplare și de precauțiile care trebuie luate la lucrul cu radiații γ .

H) Metoda cuplării indirecte

Această metodă a fost folosită pentru introducerea de brațe între suport și ligand (enzimă).

Metoda are drept rezultat păstrarea unei reactivități remanente mari a enzimei.

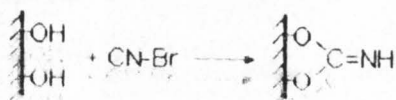
Un „spacer” lung poate scădea efectul împiedicării sterice și al interacției dintre enzimă și suport. Se folosește pentru substrat cu masă moleculară foarte înaltă. Pentru aceasta, se introduc pe suport grupări NH_2 sau COOH , după care are loc activarea propriu-zisă, conform schemelor obișnuite:

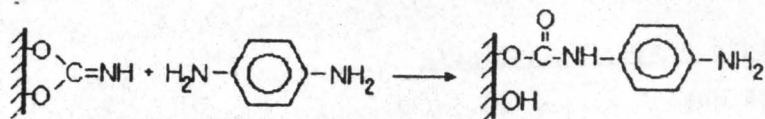


Exemple

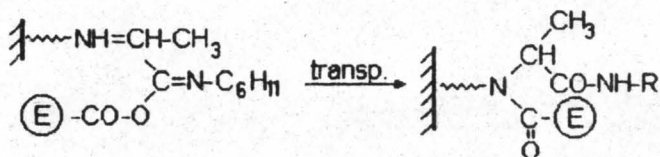
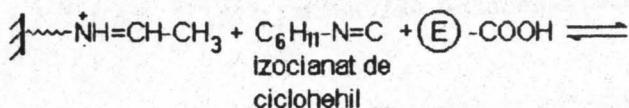
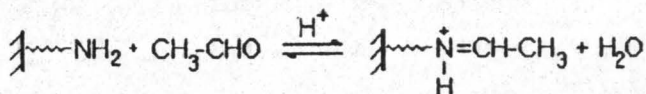
a) p-Fenilendiamino-agaroză se prepară din agaroză (suspensie 4%) sub formă de perle de gel reticulat cu epichelorhidrină.

Gelul reticulat se activează cu BrCN la $\text{pH}=11$, după care se tratează cu p-fenilendiamină în atmosferă de azot. Se obține un polimer cu grupare amină:





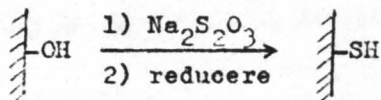
Polimerul obținut, care conține gruparea amină este tratat cu acetaldehidă și apoi cu izocianat de ciclohexil și cu enzimă (pepsină):



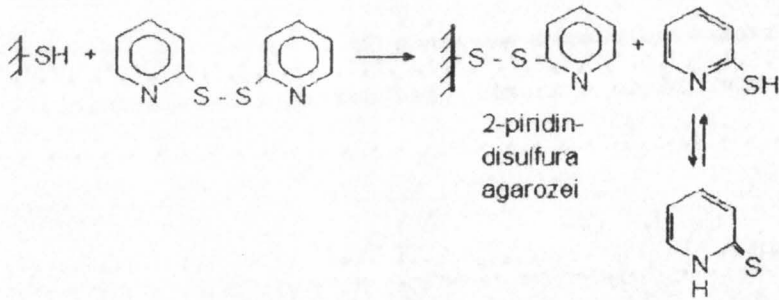
b) Mercaptoagarozza

Agaroza perlată se reticulează cu epiclорhidrină și se tratează cu $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$.

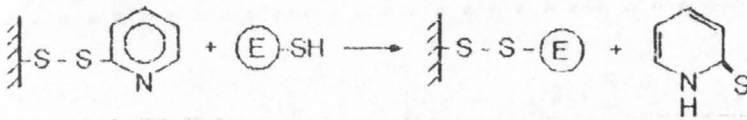
Esterul obținut (alchiltiosulfatul) se reduce la un mercapto-
gel, în care o parte din grupele OH sunt înlocuite cu grupări SH:



Acest mercapto-gel se tratează cu 2-piridindisulfură. Are loc o reacție de schimb tiol-disulfură:

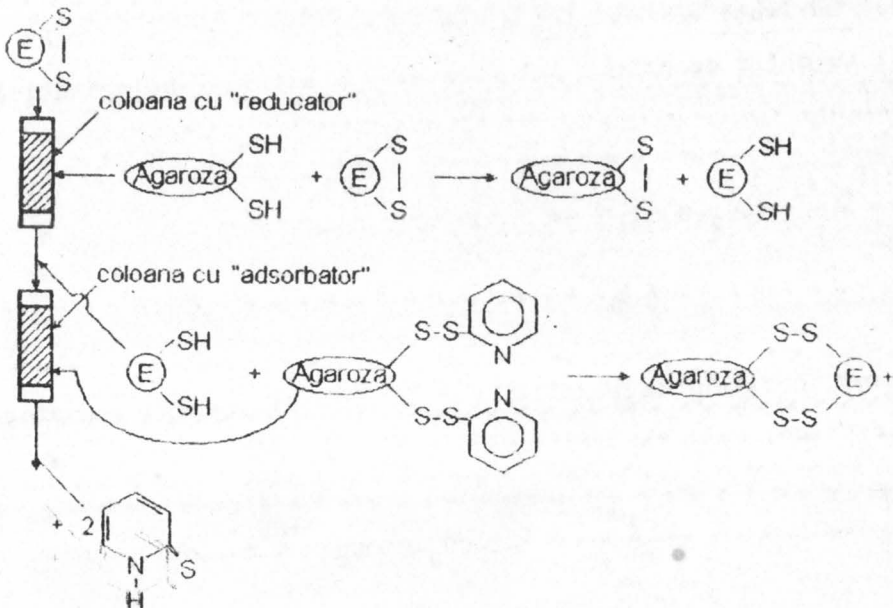


Acest suport servește la izolarea și purificarea enzimelor care conțin grupe SH:



Ulterior, s-a utilizat schimbul tiol-disulfură pentru imobilizarea unor enzime cu conservarea activității lor.

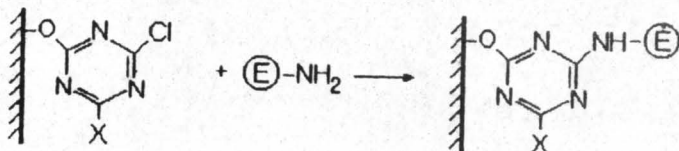
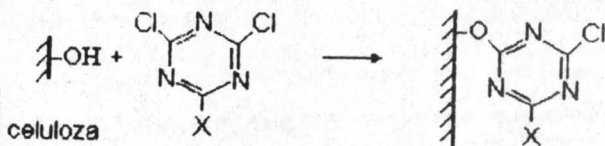
Astfel, ureaza s-a atașat pe mercapto-agaroză printr-o reacție de schimb tiol-disulfură:



2°. Imobilizarea enzimelor pe suporturi de celuloză

Activarea celulozei se poate face cu:

a) Clorură de cianuril (sau derivați S-triazinici)

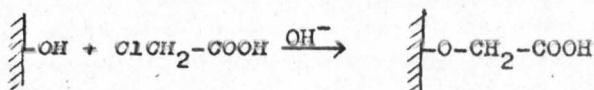


X = Cl, NH₂, NHR

b) Se mai poate folosi BrCN (ca la agaroză)

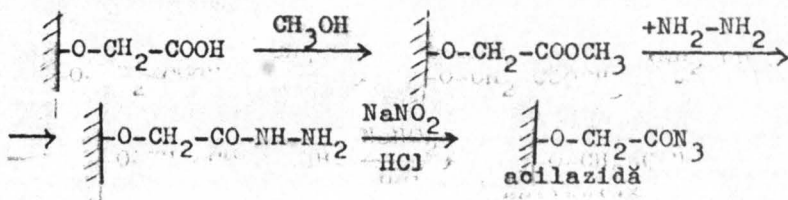
c) Derivați carboxilici ai celulozei

Ei se obțin de obicei prin tratare cu acizi α-halogenati la pH alcalin:

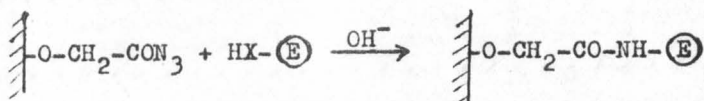


Carboximetilceluloză (CMC)

Acești derivați carboxilici pot fi folosiți pentru transformarea în azide, mult mai reactive:



Cuplarea cu enzime va avea loc astfel:



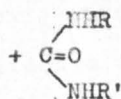
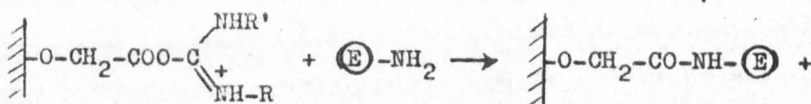
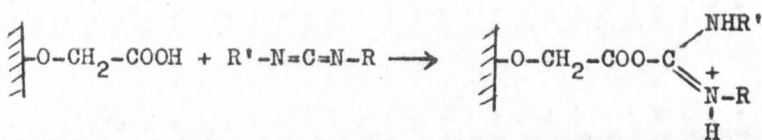
X = -S-; -NH-; -O-

Este una dintre metodele cele mai vechi și cel mai des folosite.

d) Procedeul cu N,N -diciclohexilcarbodiimidă

Se cunoaște utilizarea carbodiimidelor în sinteza unor substanțe biologice active ca: nucleotide, coenzime, acizi nucleici, peptide.

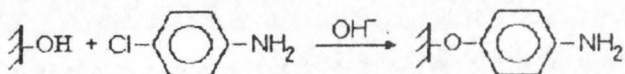
Reacțiile decurg ușor, la temperatura camerei și pH neutru:



e) Derivați aminici ai celulozei

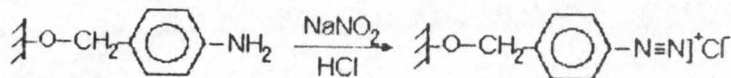
Dacă se atașează pe moleculele celulozei un rest de amină aromatică primară, acesta poate fi ușor diazotat. Se știe că sărurile de diazoniu reacționează ușor și repede cu resturile: lisil, tirozil și histidinil din proteine.

Pentru aceasta, celuloza se tratează cu o amină aromatică substituită:

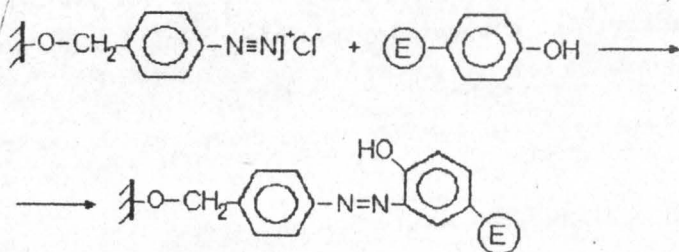


Urmează în ordine:

- diazotarea:

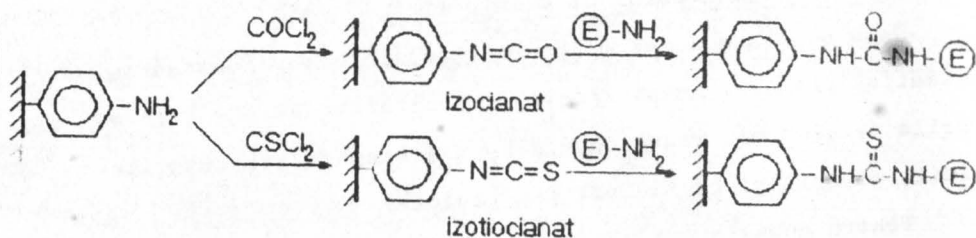


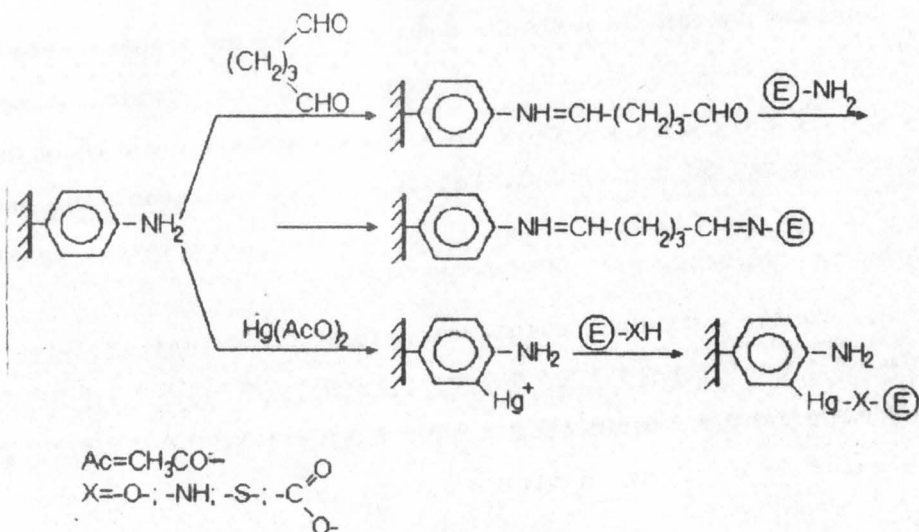
- cuplarea cu proteina:



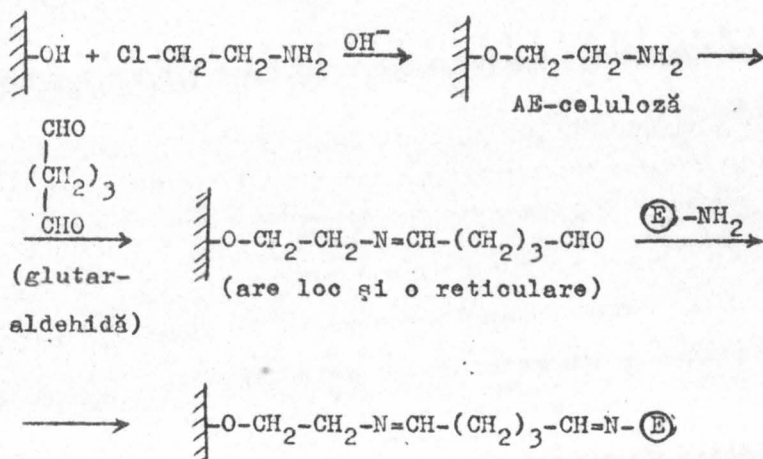
S-a găsit că prin această metodă se pot imobiliza enzimele proteolitice ce conțin resturi de tirozil, lisil și arginil.

Cuplarea enzimelor cu grupările NH_2 aromatice de pe suportul activat, se mai poate face și prin intermediul izocianaților, izotiocianaților, a sărurilor fenilmercurice sau prin dublă reticulare:





f) Se poate fixa pe celuloză și o grupare amină primară alifatică: aminoetilceluloza se obține prin reacția cu o cloramină:



Pentru o legare optimă a enzimei, concentrația glutaraldehidei în reacția cu AE-celuloză poate fi $\geq 1\%$ (greutate/volum) - până la maximum 10%.

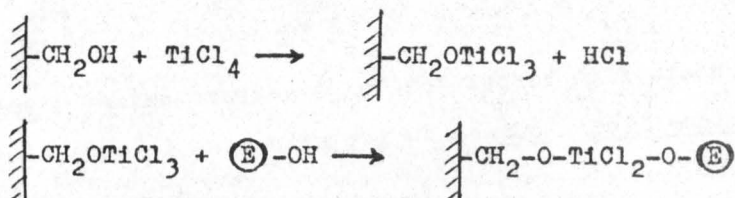
g) Derivați alchil-halogenati ai celulozei

Aceștia nu sunt accesibili comercial; ei se prepară prin acilarea grupelor OH din celuloză (de exemplu cu bromură de brom-acetil). Produsul reacționează apoi după schema cunoscută cu o grupare-NH₂ sau-SH din enzimă. Metoda prezintă dezavantajul unei insuficiente stabilități, chiar la pH neutru, a legăturii esterice formate în prima etapă:

$$\text{---O-CO-CH}_2\text{-Br}$$

h) Pentru activarea celulozei se mai pot folosi sărurile metalelor tranziționale (Ti, Sn, V, Zr etc.).

O reprezentare schematică a unei posibilități de cuplare a proteinelor cu celuloza astfel activată este următoarea:



Este totuși discutabilă stabilitatea legăturii formate, foarte dependentă de pH.

※

※

※

Cantitatea maximă de enzimă ce poate fi fixată pe celuloză modificată prin una din metodele descrise este de 100 mg/g celuloză modificată.

Activitatea remanentă a enzimei în majoritatea cazurilor este multumitoare.

Se pot folosi și schimbători de ioni celulozici (DEAE-celuloză activată cu S-triazină).

Prin acest procedeu de imobilizare majoritatea enzimelor capătă o stabilitate termică crescută.

La ficină și bromelaină se observă după imobilizare o scădere a rezistenței lor la oxidare.

În tabelul nr.17 se dau câteva exemple de enzime imobilizate pe diferite varietăți de celuloză.

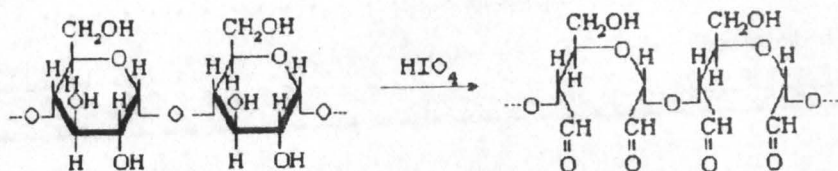
Tabelul Nr. 17

Exemple de enzime legate covalent de celuloză și celuloză
modificată

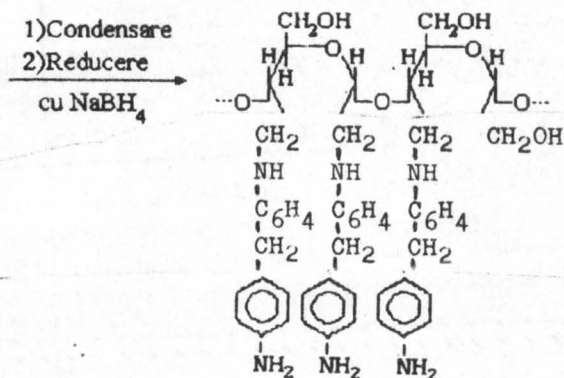
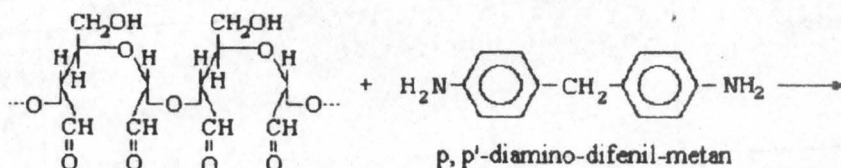
Enzima	Suportul	Metoda de legare	Conținutul în proteină al aductului (mg/g)	Activitate re-manentă(%)
Ficina	CM-celuloză	Azidă	30	13
Bromelaina	CM-celuloză	Azidă	110	52
Tripsină	AE-celuloză	Glutar-aldehidă	70	75
β -Galactozidază	AE-celuloză	Glutar-aldehidă	104	27
Lactat de hidrogenază	DEAE-celuloză	Δ -Tridzină	19	42
Chimotripsină	CM-celuloză	Δ -Triazină	52	46

3°. Imobilizare pe suporturi de amidon modificat

Pentru imobilizarea covalentă a enzimelor, amidonul, insuficient de reacționabil, se folosește sub formă de „amidon dialdehidic”, rezultat prin oxidarea cu HIO_4 :

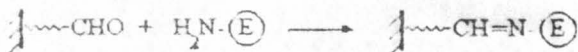


Din acest amidon modificat, Goldstein a obținut o rășină extrem de hidrofilă, care leagă o cantitate mai mare de enzimă, datorită grupărilor -NH_2 aromatice din moleculă:



Cuplarea cu enzima se poate face apoi prin intermediul sărurilor de diazoniu, după metoda descrisă mai sus, sau prin intermediul grupărilor: isocianat, tiocianat, aldehydă (prin reticulare suport-enzimă cu glutaraldehydă), sau săruri mercurice.

Cuplarea amidonului dialdehydic cu enzima poate avea loc și direct, cu formarea grupărilor azometin (baze Schiff):



Utilizarea suporturilor de amidon modificat este totuși limitată, atât datorită naturii lor gelatinoase, cât și susceptibilității lor față de unele enzime (carbohidraza).

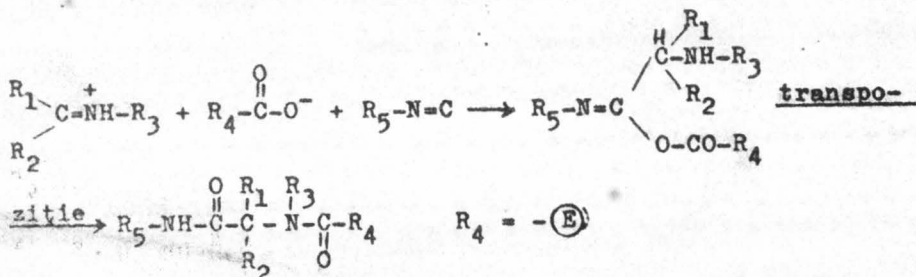
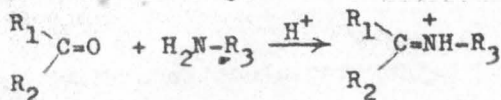
4°. Alcoolul polivinilic

Alcoolul polivinilic poate fi activat cu ajutorul metodelor aplicate în cazul polizaharidelor, fiind de asemenea folosit pentru imobilizarea enzimelor. Prezintă avantajul unei mari stabilități față de acțiunea microorganismelor în comparație cu polizaharidele.

5°. Reacția Ugi

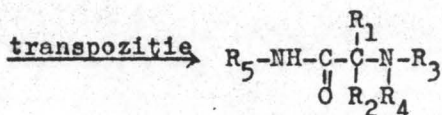
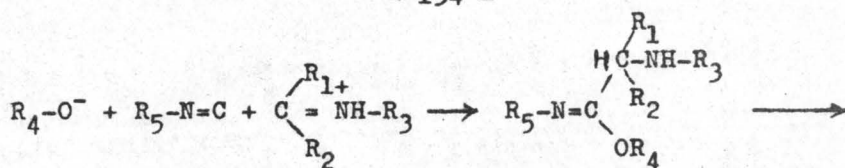
Nu este o reacție uzuală pentru că interesează grupe ca: >C=O ; -NH_2 ; izocianat; -COOH . Ea poate fi folosită pentru o mare varietate de polimeri naturali și sintetici, care conțin una dintre grupările enumerate, și pe care se pot lega proteinele ce conțin grupe NH_2 și / sau COOH .

Mecanismul reacției este:



Reacția poate avea loc și cu grupări -OH în loc de grupe

COOH :



Reacția se folosește cu succes mai ales pentru imobilizarea enzimelor pe suporturi polimerice ce conțin grupe C=O, NH₂ și -COOH.

I.2.2. Imobilizarea covalentă a enzimelor pe polimeri și copolimeri sintetici

Aceste metode de fixare a enzimelor utilizează ca suporturi o mare varietate de polimeri și copolimeri de tip poliacrilic, polivinilic ca și policondensate de tip nylon. Toate aceste materiale se utilizează în stare „preformată”, de preferință sub formă de perle.

Ca și în alte procedee de legare covalentă a enzimelor, suportul este reticulat și activat chimic în prealabil, după care are loc fixarea propriu-zisă a enzimei.

Ca suporturi se folosesc în principal trei categorii de materiale și anume:

- Polimeri și copolimeri acrilici și metacrilici;
- Suporturi de copolimeri vinilici
- Materiale poliamidice de tip nylon

I.2.2.1. Geluri pe bază de monomeri acrilici și metacrilici

(Co)polimerii acrilici și metacrilici se subîmpart în două mari clase:

A. Geluri hidrofobe (în special cele bazate pe poliacrilamidă)

B. Geluri hidrofile (polihidroxi-alchil-acrilați și polihidroxi-alchil-metacrilați)

Un interes deosebit pentru imobilizarea enzimelor îl prezintă polimerii poliacrilici reticulați, hidrofilii, cu o bună stabilitate mecanică și chimică și rezistență la degradare microbiană, pe bază de hidroxialchil-acrilați (sau metacrilați). Gelurile polimere (copolimere) pe bază de acrilamidă (AA) sunt hidrofobe.

Parametrii care determină domeniile de utilizare a materialelor enzimactice obținute pe baza acestor tipuri de polimeri sunt în principal:

- gradul de porozitate și
- compoziția chimică, ce poate fi variată prin copolimerizarea unor monomeri diferiți, într-o mare varietate.

Primele materiale organice sintetice utilizate ca suporturi pentru imobilizarea enzimelor au fost polimerii acrilici, care au servit la includerea (fizică) a enzimelor, polimerizarea având loc simultan cu includerea enzimei în gelul format. După cum s-a arătat în capitolul respectiv (pag.37) includerea fizică este însoțită într-o mică măsură de legarea covalentă a enzimei pe gelul insolubil.

În cazul imobilizării covalente a enzimelor pe asemenea materiale, se lucrează cu polimeri (copolimeri) preformați,

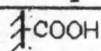
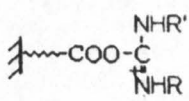
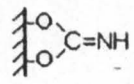
imobilizarea fiind o etapă distinctă.

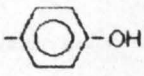
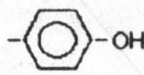
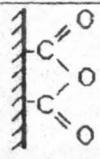
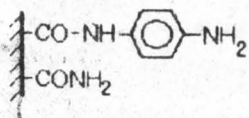
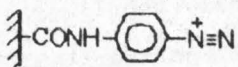
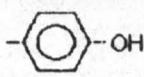
Ca și alte suporturi solide, polimerii și copolimerii acrilici, obținuți de preferință prin procedeul polimerizării în emulsie („perle”) și mai puțin prin cel al polimerizării în bloc, sunt dispersați în mediu apos și activați chimic (cu sau fără reticulare prealabilă), după care urmează reacția propriu-zisă de fixare a enzimei pe suportul activat.

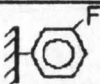
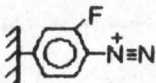
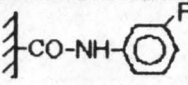
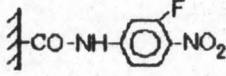
În tabelul Nr. 18 sunt trecuți în revistă principalii polimeri sintetici de tip acrilic utilizați pentru legarea covalentă a enzimelor.

Tabelul Nr. 18

Polimeri și copolimeri (met)acrilici utilizați pentru imobilizarea enzimelor

Tipul de suport cu grupare funcțională reactivă	Agenti de cuplare sau de activare	Suportul activat intermediar	Principalele grupări reactive ale enzimelor
1	2	3	4
 obținut din: - Acrilamidă/acid acrilic - Acrilamidă/acid malic	$\begin{array}{c} R' \\ \\ N \\ \\ C \\ \\ N \\ \\ R \end{array} + H^+$		-NH ₂ -SH 
 - Acrilamidă/hidroxietil-metacrilat - Hidroxialchil-metacrilat	BrCN		-NH ₂

1	2	3	4
---CONH_2 - Acrilamidă - Acrilamidă/metilmetacrilat	$\text{OHC(CH}_2)_3\text{CHO}$ glutaraldehida	$\text{---CON=CH(CH}_2)_3\text{CHO}$	---NH_2 
---CONH_2 Acrilamidă	$\text{H}_2\text{N-NH}_2$	---CO-NH-NH_2	---NH_2 ---COOH
---CONH_2 Acrilamidă	$\text{H}_2\text{N(CH}_2)_2\text{NH}_2$	$\text{---CO-NH(CH}_2)_2\text{NH}_2$	---NH_2 ---COOH
---CONH_2 - Acrilamidă - Acrilamida/metilacrilat	1) $\text{H}_2\text{N-NH}_2$ 2) HNO_2	---CON_3	---NH_2 ---SH 
 - Acrilamidă/anhidrida acidului maleic - Acrilamidă/anhidrida acidului metacrilic	-	-	---NH_2
 - Acrilamidă/anilinoaril-amida	HNO_2		---NH_2 ---SH  Histidina Arginina

1	2	3	4
 Acid metacrilic/3- sau 4-fluorostiren	1) HNO_3 2) H_2 3) HNO_2		-NH ₂
 - Acid metacrilic - Acid metacrilic/m-fluorfenil-acrilamida	HNO_3	(activat de $-\text{NO}_2$) 	-NH ₂

Etapela imobilizării enzimelor pe asemenea suporturi sunt următoarele:

1°. Polimerizarea (copolimerizarea) monomerilor acrilici

S-a preparat o mare varietate de materiale comerciale pe bază de polimeri (copolimeri) acrilici ca de exemplu:

- Bio-Gel (poliacrilamidă - PAA);
- Bio-Gel CM2 (material poliacrilic cu grupe COOH);
- Aminoetil Bio-Gel P;
- Hidrazida-Bio-Gel P;
- Enzacril AA (poliacrilamidă cu grupe amino aromatice);
- Enzacril AH (poliacrilamidă cu grupe hidrazidă);
- Spheron [poli(hidroxi-alchil)metaacrilat] etc.

Variind raportul dintre diferiți monomeri utilizați în (co)polimerizare, se obține o mare varietate de (co)polimeri, cu diferite grupări funcționale.

Polimerizarea se efectuează în mediu lichid, în bloc sau (de preferință) în „perle” (emulsie). Se obțin materiale poroase, dimensiunile și distribuția porilor depinzând de: concentrația monomerului, proporția agentului de reticulare adăugat ca: N,N-metilbisaacrilamidă-BIS-, cinetica reacției etc.

Polimerizarea (copolimerizarea) se efectuează la un vacuum ușor, la $\text{pH} \approx 7$ și în mediu inert (de N_2). Drept solvenți se pot folosi: fie apa (soluție apoasă tamponată), fie solvenți organici hidrofobi (CHCl_3 , toluen, etc), drept catalizator - TEMED (N,N,N',N'-tetrametiletilediamina), iar drept inițiatori - persulfati anorganici. În cazul polimerizării în „perle” (emulsie) se mai utilizează și stabilizatori de emulsii.

În majoritatea cazurilor se preferă procedeul polimerizării în emulsie, rezultând particule de formă sferică, cu suprafață disponibilă mare.

2°. Activarea chimică a suportului - are ca scop introducerea de grupări funcționale reactive pe suprafața acestuia. Se utilizează metodele cunoscute de activare; în funcție de structura enzimei ce urmează a fi imobilizată, se introduc diferite grupări reactive pe suport.

Dacă activarea se face cu glutaraldehidă, are loc concomitent și o reticulare a polimerului, ceea ce mărește rezistența mecanică și termică a suportului.

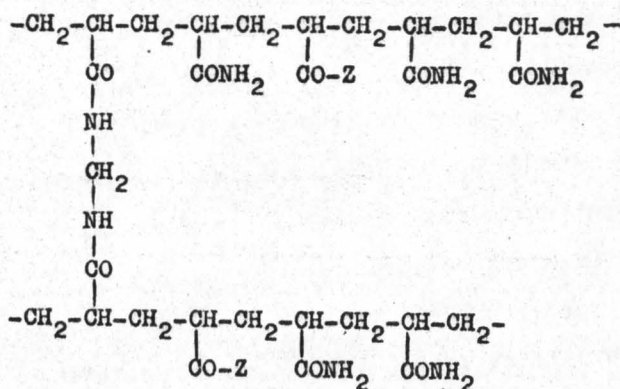
Enzaerylii sunt preparate comerciale hidrofobe pe bază de poliacrilamidă parțial reticulată.

Reticularea are loc concomitent cu polimerizarea sau copolimerizarea acrilamidei și are ca scop creșterea hidrofobității

suportului ca și sporirea posibilităților de reținere a enzimelor pe acesta. Enzimele se fixează astfel pe Enzaoryli total și ireversibil, obținându-se preparate deosebit de stabile la temperatură și stocare.

Enzaorylii conțin în moleculă grupări activatoare ca: amină, hidrazidă, tiol, lactonă etc., capabile de a reacționa cu grupele libere reactive ale enzimei.

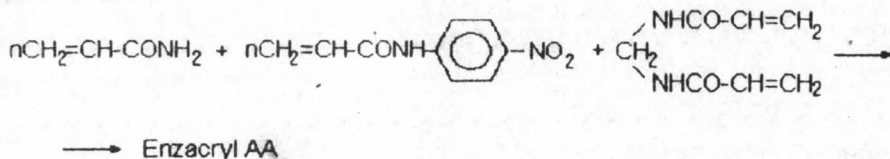
Structura generală a acestor enzaoryli reticulați cu BIS este următoarea:



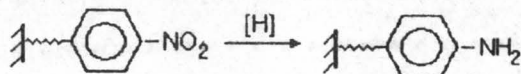
In funcție de grupările activate, se pot prepara:

Enzaorylul AA	Z = -NH-C ₆ H ₄ -NH ₂ ;
Enzaorylul AH	Z = -NH-NH ₂ ;
Enzaorylul Polithiol	Z = -NH-CH-CH ₂ -SH; COOH
Enzaorylul Politiolactonă	Z = -NH-CH-CO etc. CH ₂ S

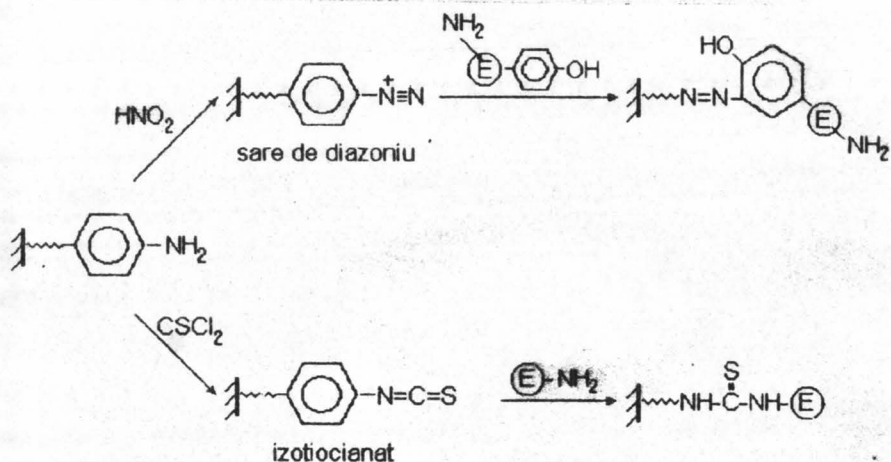
De exemplu, Enzaorylul AA se obține prin copolimerizarea AA cu p-nitroacrilanilidă și N,N-metilenbisacrilamidă (agent de reticulare):



Copolimerul astfel obținut, parțial reticulat, care conține grupe NO_2 , se reduce cu săruri de titan:



Datorită grupelor NH_2 , Enzacrylul AA se poate preactiva în scopul cuplării cu enzima, fie prin diazotare, fie prin tiofosforare:



3°. Legarea covalentă a enzimei pe suportul activat

Fixarea enzimei pe suportul activat se face în mediu apos, în soluții tamponate, la temperaturi joase (4°C). Timpul de reacție depinde de natura enzimei și a suportului, fiind de 2-20 ore.

Exemple de enzime imobilizate pe suporturi de (co)polimeri acrilici

a) Ribonucleaza A și tripsina se pot imobiliza pe diverse tipuri de (co)polimeri (met)acrilici ca:

- poliacrilamidă activată cu glutaraldehide;
- copolimer de hidroxiethylmetacrilat / acrilamidă, activat cu BrCN;
- copolimer de acid acrilic / acrilamidă etc.

b) Enzacrylii de tip AA, AH etc. se folosesc în special pentru imobilizarea α și β -amilazei, a β -D-glucosidazei, a ureazei etc.

În tabelul Nr.19 sunt date și alte exemple de biocatalizatori imobilizați covalent pe (co)polimeri sintetici.

Tabelul Nr. 19

Exemple de suporturi de (co)polimeri sintetici folosiți pentru imobilizarea covalentă a enzimelor

Suportul	Enzima	Autorii
Copolimer nylon-acrilat	β -galactozidază	Beddows și al., 1981
Glicidilmetacrilat	Invertază	Marek și al., 1984
Copolimer de poliacrilat/polietylenă	Tripsină	Beddows și al., 1982
Poliacrilamidă	Tirozinază	Vilanova și al., 1984
Metacrilat/acrilat	Urează	Raghunath și al. 1984
Nylon modificat	Urează	Miyama și al., 1984

A. (Co)polimeri hidrofobi

Aceștia au la bază în special acrilamida. Preparatele din

această categorie pot fi folosite pentru sinteze biomimetice, prin care se încearcă a se reproduce în laborator reacțiile din celulele vii, ale căror membrane au un conținut ridicat de lipide hidrofobe ca și de polielectroliți. Se pot obține membrane sintetice, hidrofobe, cu proprietăți asemănătoare celor naturale având fixate covalent pe suprafață diferite enzime. Se prepară membrane care atrag substratul, creându-se o concentrație de substrat în jurul enzimei imobilizate mult mai mare decât în restul soluției, ceea ce duce la scăderea K_m și deci la creșterea eficacității biocatalizatorului. Pentru a reproduce cât mai fidel reacțiile dintr-o membrană biologică se recomandă ca preparatul de enzimă imobilizată (membrana sintetică) să aibă sarcini electrice contrare substratului.

Astfel, pentru hidroliza enzimatică a unui substrat electropozitiv de ester etilic al α -N-benzoilargininei, se utilizează tripsină imobilizată pe un suport cu sarcini electronegative (copolimer acrilamidă/acid acrilic), cu rezultate mult mai bune decât suportul de poli-acrilamidă (neutru).

B. Geluri hidrofile

O variantă a suporturilor de tip (co)polimeri (met)acrilici o reprezintă gelurile hidrofile de tip hidroxi-alchil-(met)acrilat. Preparatele enzimatice obținute pe baza acestor suporturi se utilizează în cromatografie.

Acești polimeri se reticulează ușor și au o mare capacitate de îmbibare.

Asemenea materiale prezintă și unele dezavantaje: stabilitate mecanică scăzută (cu atât mai mult cu cât gelul este mai puțin dens) ca și o rezistență scăzută la acțiunea solvenților organici și a soluțiilor concentrate de electroliți.

(Co)polimerii cu structură macroporoasă, obținuți prin

polimerizarea în suspensie a hidroxialchil-acrilaților și/sau hidroxialchil-metacrilaților reprezintă materiale foarte bune pentru cromatografie, ca și suporturi utilizate pentru compuși biologic activi.

Asemenea suporturi se prepară sub formă de particule sferice, care în stare uscată prezintă o porozitate măsurabilă și valori ridicate ale mărimii suprafețelor active.

Dacă gelul are un grad înalt de reticulare, structura sa internă prezintă un caracter heterogen, particulele au dimensiuni microscopice și sunt greu de dispersat în solvenți.

Mărimea și distribuția porilor particulelor pot fi controlate prin ajustarea condițiilor de (co)polimerizare.

În funcție de condițiile de lucru se pot obține particule cu dimensiuni de $5\mu\text{m}$ - 3 mm, filme, blocuri și tuburi, masa moleculară a (co)polimerizatelor variind între 1.000 și 10.000.000.

Etapale obținerii unor preparate de enzime imobilizate pe asemenea geluri preformate vor fi:

-Copolimerizarea

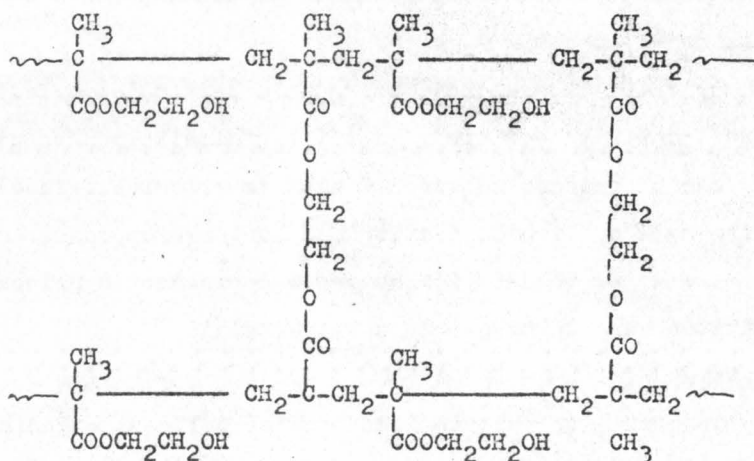
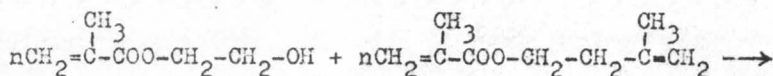
Gelurile de hidroxialchil-metacrilați se formează prin (co)-polimerizarea radicalică în suspensie, într-un mediu apos, conținând un stabilizator de suspensie.

Se folosește ca mediu de dispersie apa, monomerul fiind dizolvat într-un solvent miscibil cu apa. La începutul polymerizării mediul este omogen. Pe măsură ce reacția avansează, se separă două faze, polymerizarea continuând în mediu heterogen.

Porozitatea polymerului (copolimerului) rezultat depinde mai ales de cinetica reacției.

Distribuția dimensiunilor particulelor este funcție de tipul și concentrația stabilizatorului suspensiei, ca și de eficiența agitării amestecului de reacție.

Structura chimică a unui gel de copolimer de 2-hidroxietyl-metacrilat/etilen-metacrilat (Spheron, Hydron) va fi:



Concomitent are loc și o reticulare. Acest copolimer este cel mai utilizat.

Etilenmetacrilatul este agent de reticulare și se adaugă în cantitate de $> 20\%$. Se mai utilizează un stabilizator de suspensie (polivinil-pirolidona).

Caracterul hidrofil al copolimerului este determinat de grupele OH și poate varia în funcție de gradul de reticulare (agentul de reticulare mărind partea hidrofobă a moleculei).

La o reticulare prea avansată, grupele OH rămân „incluse” („împachetate”) în masa polimerului și nu mai sunt accesibile solvării sau reacțiilor chimice în soluții.

Procentajul optim de grupe OH conținute în molecula copolimerului este de $\sim 80\%$ atunci când acesta se folosește în reacțiile

de obținere a unor produși cu masă moleculară redusă (acetilări, eterificări, obținere de alcoxizi). Cantitatea de grupe OH disponibile pentru aceste reacții descrește proporțional cu creșterea masei moleculare a produșilor de reacție. Acest lucru este luat în considerație pentru etapa de activare chimică a suportului. Dacă grupele OH servesc la introducerea unui braț lateral (spacer), reactivitatea acestora este influențată de distanța față de grupele din gelul-suport.

Polimerizarea în suspensie conduce la particule perfect sferice cu deformabilitate minimă, ce pot fi folosite pentru umplerea unor coloane care nu se tasează nici la trecerea prin ele a unor debite mari de lichid. Particulele sunt macroporoase, gradul de dispersare a lor în diferiți solvenți depinzând în principal de polaritatea suportului și cea a solventului.

— Activarea

Ca și pentru alte suporturi pe bază de polimeri organici, se pot obține hidroxialchilmetacrilati modificați chimic prin trei căi:

- a) Prin activarea chimică a grupărilor OH disponibile de pe suprafața polimerului preformat.
- b) Prin copolimerizare cu monomeri ce conțin una sau mai multe grupări reactive ce se regăsesc final în copolimerizat.
- c) Prin copolimerizare cu monomeri conținând un precursor de grupă funcțională reactivă, urmată de transformarea precursorului după polimerizare.

În cele ce urmează vor fi date câteva exemple reprezentative pentru aceste metode.

- a) Grupa hidroxietil din Spheron se poate activa chimic prin metodele folosite la suporturile de polizaharide (Sephadex, Sepharoză, celuloză etc.). Spre deosebire de polizaharide, reacțiile

de activare se produc în condiții mult mai drastice, în medii ne-apoase sau cu agenți în fază gazoasă. Gelurile se activează cu: BrCN , diizocianați, ditioizocianați, anhidride, cloruri acide, COCl_2 și bromură de bromacetyl.

Gelurile astfel modificate (activate) sunt macroporoase și se pot păstra sub formă uscată, uneori în atmosferă inertă (N_2).

Gelurile se mai pot activa prin introducerea unui „Spacer” (cu hexametilendiamină, acid ϵ -aminocaproic); urmează apoi etapa fixării enzimei. Pentru legarea enzimei se utilizează carbodiimide solubile.

Un „spacer” se mai poate obține prin polietoxilarea grupelor OH libere de la suprafața gelului, ceea ce mărește caracterul hidrofil al acestuia.

b) Proprietățile chimice ale suprafețelor macroporoase de geluri de hidroxialchilmecacrilat se mai pot modifica prin copolimerizare cu monomeri conținând grupări funcționale ce se regăsesc final în copolimer. În cazul adăugării acestor monomeri, este necesară modificarea condițiilor de reacție pentru a se putea separa copolimerizatul ca o fază distinctă, din amestecul de reacție.

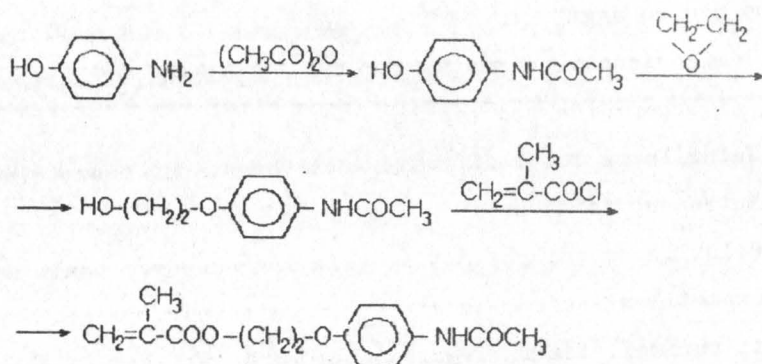
Prin această metodă se obțin schimbători de ioni macroporoși, dacă se utilizează monomeri ce conțin grupe funcționale ionogene.

De exemplu, suporturi ce conțin grupe esterice reactive se obțin prin copolimerizarea în suspensie a respectivilor monomeri în condiții în care grupele esterice să nu se hidrolizeze.

c) Acest procedeu este o copolimerizare a metacrilatilor hidrofilii cu un agent de reticulare și un monomer conținând un precursor al unei grupări funcționale reactive față de substanțele biologic active.

Un asemenea precursor poate conține o grupare amidă. Astfel,

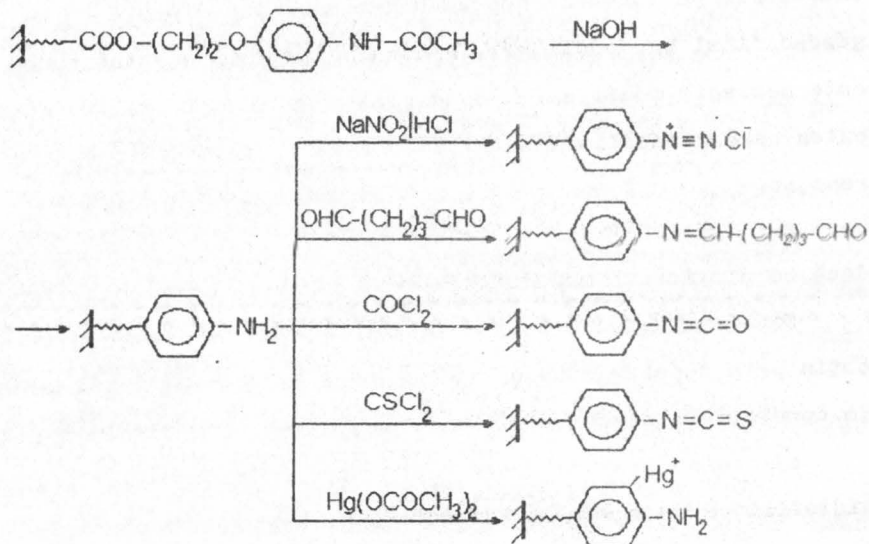
precursorul poate fi APEMA (p-acetilaminofeniletoximetacrilat):



APEMA

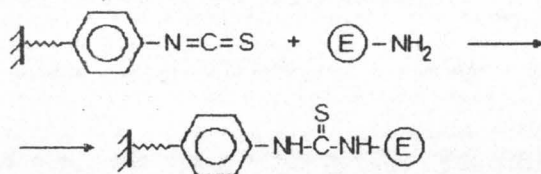
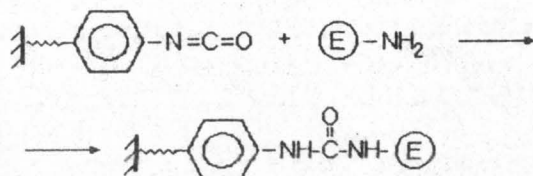
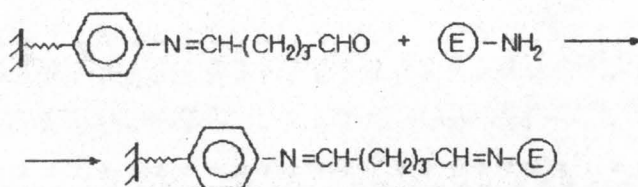
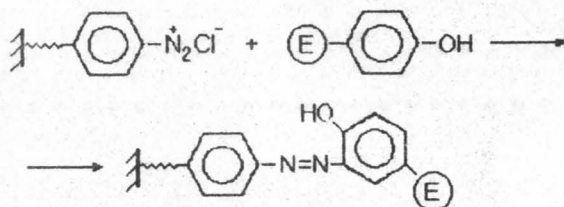
Acesta este monomerul precursor.

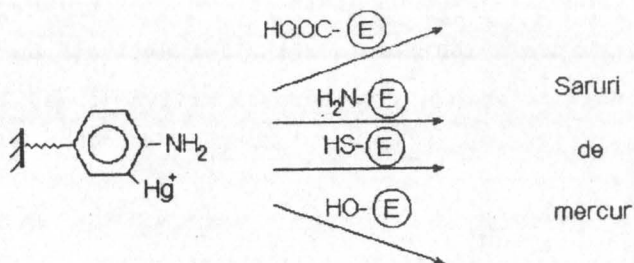
Copolimerul obținut ulterior se modifică astfel pentru a se activa gruparea precursoră (amidă):



Suporturi foarte bune sunt și copolimerii macroporoși ce conțin glicidilmetacriilați; gruparea epoxi terminală fiind foarte reactivă față de grupările NH_2 , OH și SH libere ale enzimelor.

Proprietățile hidroxialchil-metacriilaților activați cu precursori sunt analoage cu cele ale Sepharozei activate, modul de fixare a enzimelor fiind asemănător:

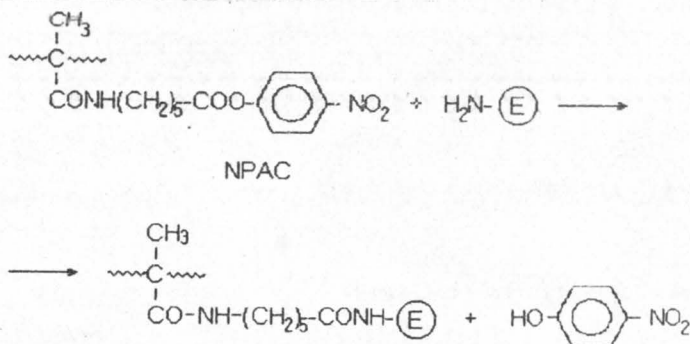




Exemple de enzime ce se pot imobiliza pe suporturi de (co)polimeri (met)acrilici hidrofilii

- Pepsina se fixează pe Spheron activat cu grupe- NH_2 (amino-Spheron) sau- COOH (carboxi-Spheron), în prezența unor carbodiimi-de de solubile. Ambele preparate își mențin activitatea remanentă inițială timp de 30 zile, dacă sunt păstrate la $+4^\circ\text{C}$.

- Papaina se imobilizează pe esterul p-nitrofenolic al ge-lului de hidroxialchil-metacrilat (NPAC), printr-o reacție de trans-aminare:



Activitatea proteolitică maximă a papainei imobilizată pe gel de NPAC, se situează la $\text{pH} \sim 7$.

- Tripsina și chimotripsina se pot fixa pe geluri de diazo-, hidrazido- și anhidrido- hidroxi-alchil-metacrilati.

Se observă că legarea covalentă a chimotripsinei pe geluri de Spheron ca și activitatea catalitică a aducătorilor depind de aria suprafeței particulelor de gel (Tabelul Nr. 20).

Se observă că, cantitatea de CHT legată este proporțională cu suprafața specifică a gelurilor, pe când cantitatea de glicină legată variază puțin cu numărul de grupări-OH reactive. Cantitățile de CHT și de glicină legate s-au determinat prin analiza cantitativă a aminoacizilor rezultați prin scindarea acidă a proteinei. Activitatea proteolitică a CHT libere și imobilizate s-a determinat prin metoda Anson modificată, utilizând ca substrat hemoglobină denaturată. Activitatea esterolitică a CHT a fost determinată prin metoda Axén și Ernback, utilizând ca substrat esterul etilic al N-acetil-L-tirozinei.

I.2.2.2. Suporturi de copolimeri vinilici

Gama suporturilor de polimeri sintetici utilizați, la imobilizarea covalentă a enzimelor se poate extinde, dacă se supun copolimerizării trei componente diferite ce conțin duble legături activate, dintre care cel puțin o componentă este de tip vinilic.

Monomerii utilizați pot fi: acidul metacrilic și derivații săi (esteri, amidă, enilide etc.), alcoolul vinilic, derivați ai etilenglicolului, stiren și 1,4-divinilbenzen, anhidridă maleică, N-vinilpirolidonă etc.

Variind cele trei componente diferite supuse procesului de copolimerizare, se poate obține un număr mare de suporturi cu

Tabelul Nr. 20

Dependența cantității de Chimotripsină (CHT) legată pe geluri
de hidroxialchil-metacrilati (Spheron) de aria suprafeței particulelor de gel*

Masa moleculară a gelului de Spheron	Supraf. specifică (m ² /ml)	Cant. de glicină legată (mg/ml)	Cant. de CHT legată (mg/ml)	Activitate proteolitică (A ₂₈₀ /min ml)	Activit. proteolit. relativă	pH optim al acti- vit. es- terolitice	Activit. esterolit. (μmol/ml per min.)	Activit. esterazică relativă (%)
10 ⁵ - 10 ⁸	0,96	0,5	0,73	-	-	-	-	-
10 ³ - 10 ⁶	5,9	3,1	7,8	1,23	44	9,4	305	29
700-700.000	3,6	2,8	6,7	1,17	49	9,1	392	43
500-500.000	23	2,6	17,1	2,28	37	9,2	310	35
300-300.000	19,5	3,15	17,7	2,8	44	9,1	1320	55
200-200.000	0,6	2,3	6,9	1,33	53	9,0	626	67
100-100.000	0,2	2,6	4,3	0,58	38	9,1	354	61

* Dimensiunile particulelor de gel sunt de 40-80 μm.

caracter neutru sau ionic. Dintre acestea, suporturile cu grupări ionizate au o hidrofilitate bună.

Suporturile obținute prin acest tip de copolimerizare prezintă avantajul că formează legături covalente puternice cu enzimele prin intermediul unor grupări reactive preexistente în moleculele monomerilor sau prin modificarea copolimerizatului cu introducerea în molecula sa a unor grupări care reacționează cu enzimele.

Pe aceste tipuri de suporturi enzimele se leagă puternic, iar preparatele obținute au o activitate foarte apropiată de cea a enzimelor libere. Suporturile pot fi macroreticulate sau dispersate sub formă de particule de dimensiuni mici, ceea ce ușurează accesul la suport al enzimei ca și al substratului.

Numărul și natura grupărilor reactive conținute de suport influențează direct capacitatea acestuia de a fixa enzima. Un număr mare de grupări reactive duce la fixarea covalentă a unor cantități mari de enzimă, ceea ce micșorează hidrofilitatea suportului, fără a determina o deteriorare a posibilității de dispersare a acestuia.

Dacă suportul este înalt reticulat, aceasta conduce la descăderea dispersabilității sale și deci, a cantității de enzimă legată.

În cazul suporturilor de policondensate ionice, dispersabilitatea lor este dependentă de pH, acest fapt influențând și ușurința de fixare a enzimei.

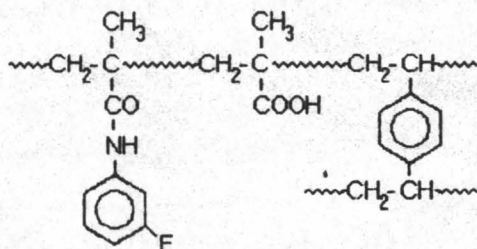
Ușurința cu care un suport sau altul fixează enzima depinde și de concentrația soluției de enzimă supusă imobilizării. Astfel, în soluții cu concentrații mari de enzimă, se imobilizează cantități mari. Cu toate acestea, se preferă să se lucreze cu soluții de enzimă de concentrații mici, activitatea enzimei fiind mai

eficient utilizată.

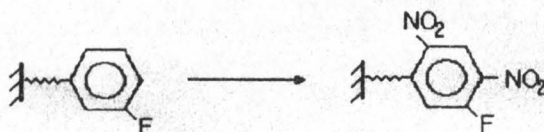
Pe asemenea suporturi se imobilizează cu succes enzime ca: alcool-dehidrogenaza, glucooxidaza, invertaza, papaína, alcalin-fosfataza, ureaza etc.

Exemple de suporturi - copolimeri vinilici

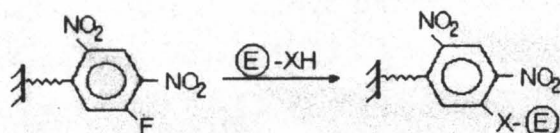
a) Un suport anionic se obține prin copolimerizarea 3-F-anilidei acidului metacrilic cu acid metacrilic și 1,4-divinilbenzen:



Urmează nitrarea (pentru activare):

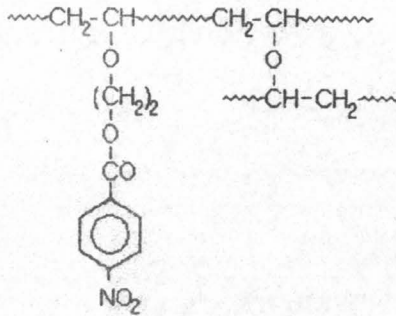


Fixarea enzimei are loc printr-o reacție de substituție aromatică nucleofilă a F, facilitată de prezența celor două grupări NO_2 din nucleul benzenic:

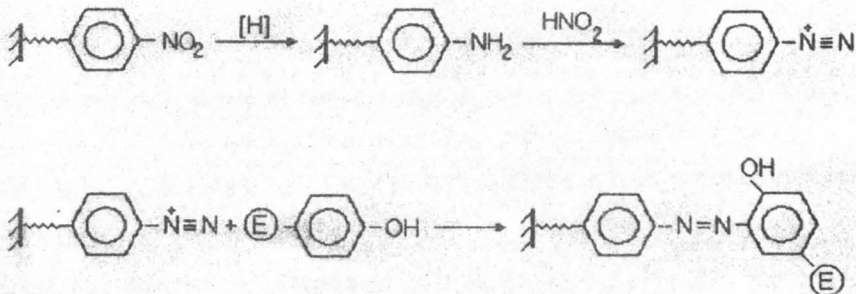


$\text{X} = \text{O}; -\text{S}; -\text{COO}; -\text{NH}$

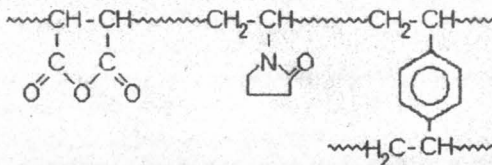
b) Un suport cationic se obține din alcool vinilic și p-nitrobenzoat de etilenglicol (2:1):



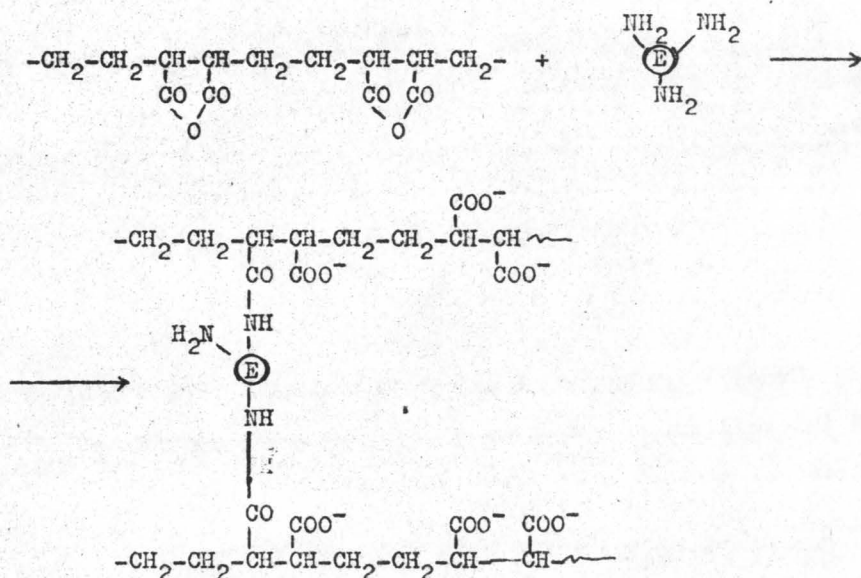
Urmează reducerea și activarea grupării $-NH_2$ aromatice formată intermediar, capabilă de a cupla cu resturile de: tirozină, lisină și arginină din molecula enzimei:



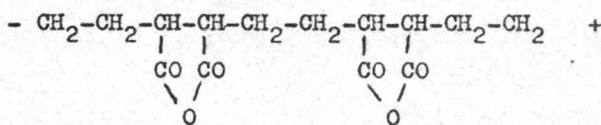
c) Un suport neutru se obține prin copolimerizarea anhidridei maleice cu N-vinil-pirolidonă și cu 1,4-divinilbenzen:

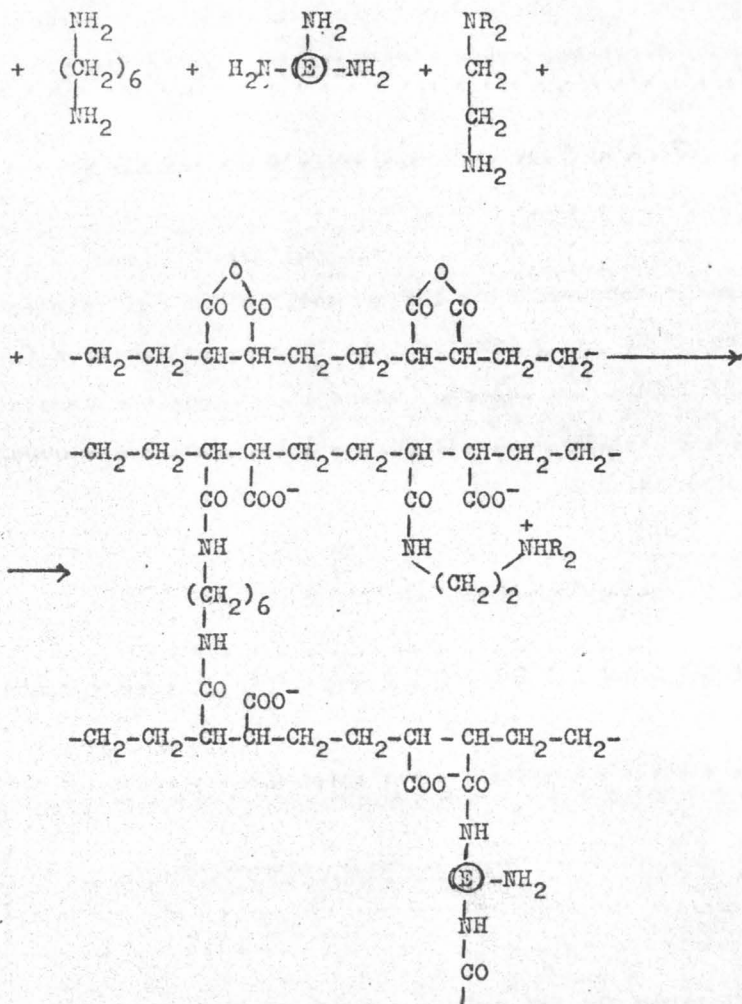


O variantă a metodei care folosește un suport pe bază de anhidridă maleică polymerizată, poate fi aplicată în cazul enzimelor cu conținut ridicat de grupări -NH_2 libere în moleculă. Enzima poate reticula în acest caz polimerul sintetic:



Formarea aductului are loc prin alăugarea enzimei la prepolimer (anhidrida maleică), polymerizarea și legarea biocatalizatorului decurgând sincron. Pentru o reticulare mai avansată a copolimerului se poate introduce în amestecul de reacție și un agent de reticulare dibazic (diamine alifatic):





Activitatea enzimelor imobilizate prin copolimerizare cu anhidridă maleică poate varia de la valori foarte mici la valori mai mari de 100% față de cea a enzimelor libere. Activitatea enzimatică a aducătorilor depinde de factori ca: grupările funcționale afectate din moleculele enzimelor, dimensiunile substratului, sarcinile electrice etc.

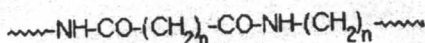
Cantitatea maximă de enzimă cuplată poate fi de 80/20 în greutate (enzimă/polimer).

Copolimerii de enzimă-anhidridă maleică își păstrează activitatea și după uscare, având o rezistență mare la stocare.

I.2.2.3. Suporturi poliamidice de tip Nylon

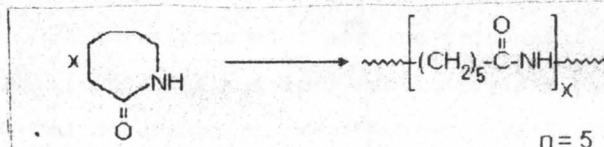
În afară de suporturile de tip polimerizate sau copolimerizate pe bază de monomeri vinilici și acrilici se mai folosesc și policondensatele sau polimerizatele lineare poliamidice (nylon).

Ca structură, se observă că în lanțul policondensatului (polimerului) se repetă un număr variabil de grupe $-\text{CH}_2-$ separate prin grupări amidice:



În funcție de valoarea lui n , se obțin diverse varietăți comerciale:

- Nylon 6 (obținut din caprolactamă):



- Nylon 610 obținut prin policondensarea 1,6-diaminohexanului cu acid sebacic: $-\text{NH}-\text{CO}-(\text{CH}_2)_{10}-\text{CO}-\text{NH}-(\text{CH}_2)_6-\text{NH}-\text{CO}-$

- Nylon 66 obținut din hexametildiamină și acid adipic:

$-\text{NH}-(\text{CH}_2)_6-\text{NH}-\text{CO}-(\text{CH}_2)_6-\text{CO}-\text{NH}-$, etc.

În general, nylonul este un suport atractiv pentru imobilizarea enzimelor (atât chimică cât și fizică), deoarece este ușor de transformat în filme, membrane, pulbere, pânză, „Hollow-fiber” tuburi etc. Nylonul prezintă o mare rezistență mecanică și nu este biodegradabil.

Unele varietăți (N6 și N66) sunt relativ hidrofile și compatibile cu mediul apos în care se face imobilizarea enzimelor.

Prin procedee fizice unele enzime se imobilizează în microcapsule cu membrane semipermeabile de Nylon. În alte procedee, enzimele se adsorb pe suprafața Nylonului a cărui rezistență se mărește prin reticulare. Imobilizarea fizică poate fi combinată deci cu reticularea.

Astfel, Edelman și colab. au imobilizat antigene prin adsorbție pe filamente de Nylon de grosime monomoleculară, după care au efectuat o reticulare cu o carbodiimidă solubilă în apă.

S-au imobilizat enzime și pe pelicule de Nylon sau pe flocoane. Enzima se fixează în acest caz la suprafața Nylonului prin reticulare cu glutaraldehidă. În acest fel se fixează urenza și gluco-oxidaza. În toate aceste cazuri imobilizarea are loc concomitent cu policondensarea (cap. I.2.2).

Imobilizarea covalentă a enzimelor pe Nylon se face cu Nylon brut, preformat, care de obicei are masă moleculară mare și conține un număr mic de grupe terminale. De aceea, Nylonul trebuie activat pentru a putea reacționa cu enzimele.

Pentru activare, care are loc înainte de imobilizarea propriu-zisă, se iau în considerare trei procedee:

1° - Componentele legăturilor amidice substituite din lanțul poliamidic sunt grupele -COOH și -NH_2 provenite de la compuși alifatici, deci specii potențial reactive. Acești centri pot fi activați (regenerați) prin ruperea legăturilor amidice din Nylon cu eliberarea grupărilor -NH_2 și -COOH .

2° - Se pot introduce centrii reactivi în molecula de Nylon, de exemplu prin O-alkilarea grupei amidă secundară. Se obțin săruri reactive ale imidaților, nefiind necesară depolimerizarea suportului.

3° - Se pot genera centri reactivi printr-un proces care implică hidroliza acidă parțială a Nylonului. Legăturile amidice scindate în acest proces se reconstituie printr-o nouă condensare care are loc prin reacția grupelor NH_2 și COOH rezultate cu o aldehydă și un izocianat. Prin această metodă se obține un nylon intact, care conține centri reactivi formați prin N-substituția produsului de scindare a grupei amidice secundare din suport.

1°) Imobilizarea covalentă a enzimelor pe Nylon prin metode care implică scindarea legăturilor amidice

Prima etapă în acest procedeu este depolimerizarea parțială a Nylonului prin ruperea câtorva legături amidice secundare. Legătura amidică din Nylon se poate rupe în mediu neapos (un solvent), când este posibil să rezulte gruparea NH_2 liberă și gruparea COOH să fie blocată cu un reactiv corespunzător (N,N-dimetil-1,3-propandiamină) ca în fig. nr.12 (calea 1). Dacă are loc o scindare acidă în mediu apos (calea 2) din fig. nr.12 atunci va rezulta o grupare carboxilat iar gruparea NH_2 formată prin hidroliză poate fi condensată cu enzima prin intermediul unei dialdehide (glutaraldehida).

Gruparea $-\text{NH}_2$ eliberată mai poate fi condensată cu enzimele și prin alte metode cunoscute (prin izocianați, tioizocianați, 4-triazine etc). Pe de altă parte grupările $-\text{COOH}$ formate prin hidroliză parțială pot fi activate la rândul lor, pentru a fi condensate apoi cu enzimele, după schemele cunoscute din cap. I.2.

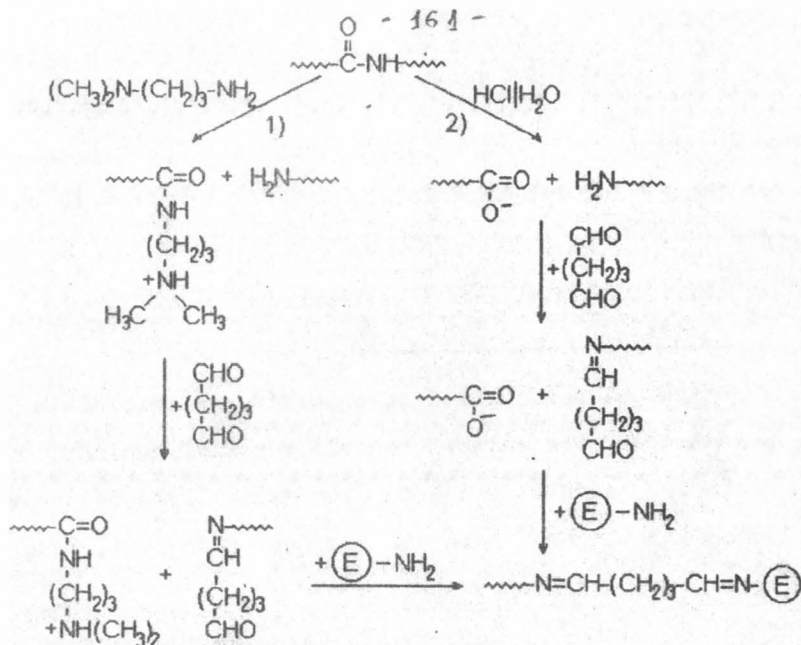
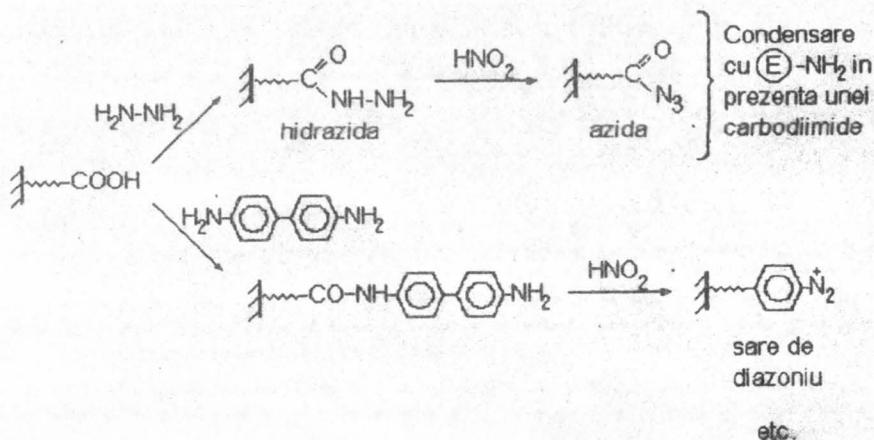


Fig. nr 12

Schema generală a activării unui suport de Nylon pentru fixarea covalentă a enzimelor



Dezavantajul principal al acestei metode de activare a Nylonului este obținerea unui suport modificat, cu sarcini electrice după varianta de scindare folosită (în prezența sau în absența apei), ceea ce impune restricții mai ales față de substratele cu grupări ionogene.

2^o) Imobilizarea covalentă a enzimelor pe Nylon
modificat prin O-alchilare

Metoda descrisă mai sus implică depolimerizarea parțială a Nylonului, cu scopul de a se elibera centrii reactivi necesari cuplării cu enzimele. Această metodă nu este satisfăcătoare pentru toate cazurile de imobilizare, deoarece, în urma scindării, este influențată rezistența mecanică a suportului.

O metodă de compromis, nedistructivă, dar care generează grupări funcționale reactive, este O-alchilarea grupărilor amidice din lanțul polimerului, în prezență de BF_3 eterat, în absența apei, în soluție de CH_2Cl_2 (fig. Nr. 13).

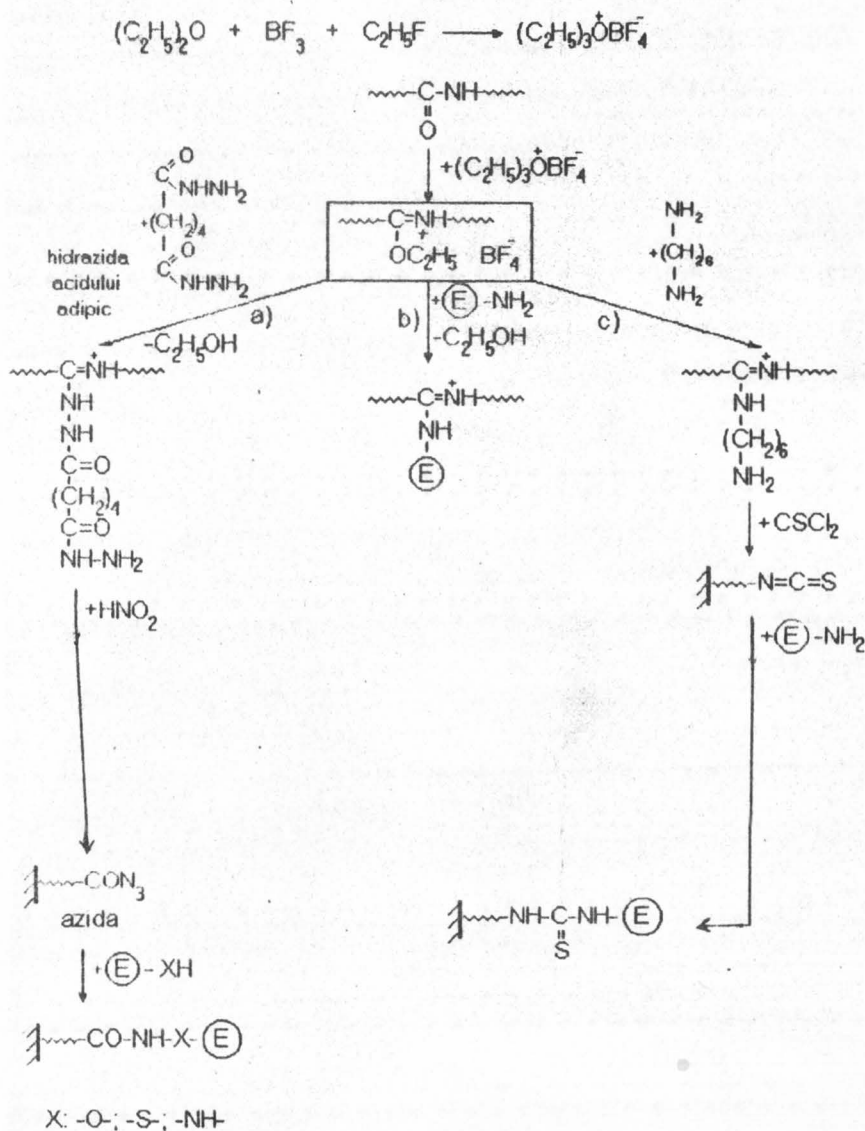
Se obțin astfel săruri ale imidaților, care fie că pot reacționa direct cu enzima, fie că pot fi activate intermediar, prin introducerea unui „spacer”, urmată de reacția cu molecula proteinei.

După cum se observă din fig. Nr. 13, enzima poate fi legată direct pe suportul modificat [calea b)] sau prin intermediul unui „spacer” [a) și c)].

Un inconvenient al acestei metode este că molecula inițială neutră a Nylonului capătă sarcini pozitive, ceea ce restrânge posibilitățile de utilizare ale aducțiilor enzimă-suport.

Fig. Nr. 13

Schema fixării enzimelor pe Nylon O-alehilat

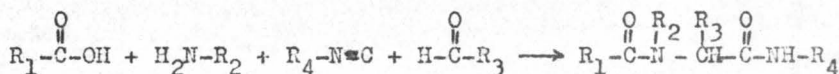


3^o) Legarea covalentă a enzimelor pe Nylon modificat prin metoda N-alkilării

Această metodă constă în hidroliza parțială a moleculei de Nylon și refacerea ulterioară a lanțului polimer, prin N-alkilarea (cu scop de activare) a grupărilor aminice rezultate din scindarea inițială. Rezistența mecanică a Nylonului nu este influențată decisiv prin acest procedeu și în plus, se evită apariția unor grupări încărcate electric pe suportul polimer. Vor fi deci două etape succesive:

a) - hidroliza parțială controlată în soluție tampon, la pH neutru, a unor grupări $-\text{CO}-\text{NH}-$ de pe suprafața Nylonului; rezultă perechi de grupări $-\text{COOH}$ și $-\text{NH}_2$ și

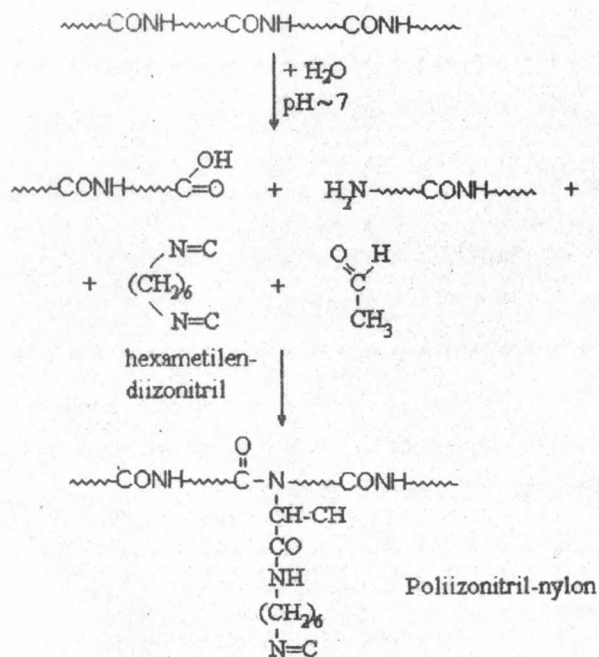
b) - formarea unor noi legături între perechile de grupări $-\text{COOH}$ și $-\text{NH}_2$, prin intermediul unei reacții de condensare („reacția celor patru componente”), care are loc după schema de mai jos (L. Goldstein, A. Niv și S.A. Yankofsky):



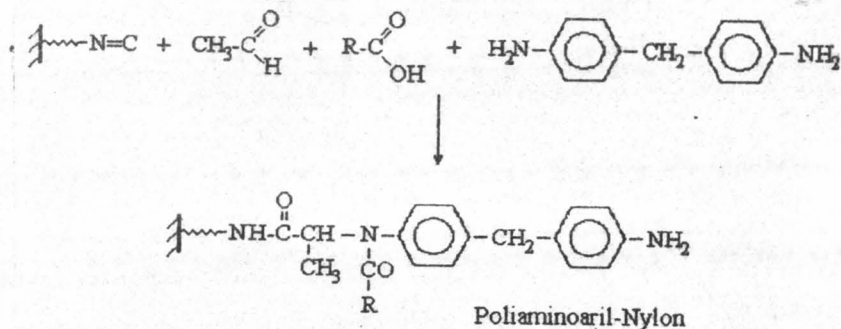
sau

Grupă	O	R ₂	R ₃	
provenită	R ₁ -C	N	CH	CO-NH-R ₄
din				
rest de	Acid carboxilic	Amină	Aldehidă	Izonitril

De exemplu în acest fel se poate obține un poliisonitril-nylon:



Pentru a se cupla cu enzima, gruparea izocian din poliizonitril-nylon se poate modifica prin reacția Ugi (pag.133)



În polimerul astfel modificat, gruparea $-NH_2$ aromatică poate fi apoi activată printr-o metodă obișnuită (sare de diazoniu, izocianat, izotiocianat etc.), pentru a se cupla cu enzima.

Acest procedeu de imobilizare a enzimelor pe Nylon N-alchilat poate fi ușor adaptat la diverse varietăți de Nylon, sub formă de: tuburi, fibre, plăci etc.

I.2.3. Imobilizarea enzimelor prin reticulare (agregare)

Ca procedeu general, reticularea unei macromolecule liniare are ca scop transformarea sa într-o structură tridimensională; agenții de reticulare fiind de obicei di- sau polifuncționali posedă grupări reactive ce pot lega covalent două macromolecule cu structură liniară.

Cum enzimele sunt formate din lanțuri peptidice, agenții polifuncționali specifici, care pot reacționa cu grupările libere din lanțul polipeptidic (OH , SH , NH_2 , $COOH$) le pot insolubiliza prin reticulare, chiar în lipsa suporturilor.

Reticularea enzimelor poate fi:

- Intramoleculară;
- Intermoleculară

I.2.3.1. Reticularea intramoleculară

Tehnicile și reactivii utilizați pentru reticularea intramoleculară sunt în general aceiași cu cei folosiți la reticularea intermoleculară.

Majoritatea legăturilor intramoleculare din moleculele proteinelor sunt de tipul disulfură ($-S-S-$), care determină o structură tridimensională permanentă a celor mai multe proteine

globulare. In cazul unor proteine structurale, legăturile -S-S- multiple contribuie la rigiditatea structurală și la inerția ridicată a complexilor moleculari. In cazul unor proteine foarte stabile și inerte metabolic ca elastina și collagenul din țesuturile conjunctive, unica legătură încrucișată derivă de la lisină și hidroxilisină deaminate oxidativ și contribuie la proprietățile structurale și la inerția metabolică a acestor proteine.

In toate cazurile de reticulare intra-sau intermoleculară există două metode generale:

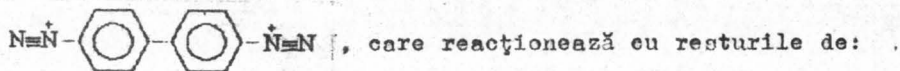
- reacția cu agenți bi- sau polifuncționali și
- activarea și cuplarea grupelor funcționale existente în proteină cu diverși agenți de condensare. In acest caz agentul de condensare poate fi un simplu reactiv organic sau o moleculă de enzimă.

Condițiile de reticulare se stabilesc empiric de la caz la caz.

In 1972 și 1973, Wold a clasificat reactivii difuncționali și condițiile de reacție ale acestora cu diverse proteine (tabelul nr.21).

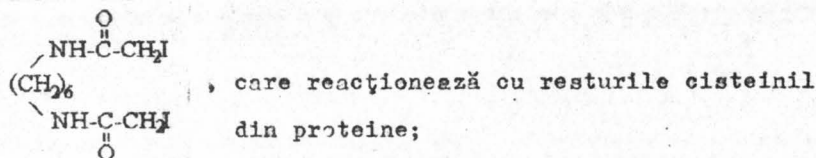
In afară de agenții difuncționali specificați în tabelul nr.21 se mai pot folosi:

- bis-diazobenzidina și derivații săi:



lizil, histidil, tirozil, arginil, cisteinil din proteine;

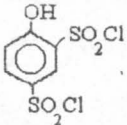
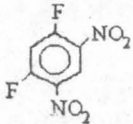
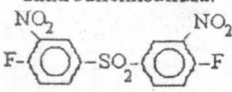
- hexameten-bisiodoacetamida:

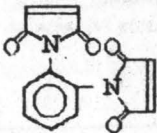


Tabelul Nr.21

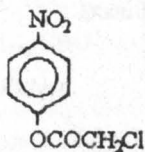
Reactivi difuncționali de reticulare

Clasa de reactivi comerciali	Grupările din proteină cu care reactionează	pH optim de reactie	Proteinele cu care reactionează
1	2	3	4
Diimidoeteri	-NH ₂	8 - 10	Gliceraldehidfosfat-de-hidrogenaza; Aspartat-transcarbamilaza; L-arabinozo-izomeraza; Steraldehidrogenaza; Glicerokinaza; Fosfo-fructo-kinaza; Izopropil-maleat-sintetaza; Glutamat-dehidrogenaza; Piruvat-kinaza etc.
OHC-(CH ₂) ₃ -CHO Glutaraldehida	-NH ₂	> 7	Papaina, glutamat-dehidrogenaza, glicogen-fosforilaza, tripsina, invertaza etc.
Diizocianati aromatici si alifatici ca: $O=C=N-(CH_2)_6-N=C=O$ si diizotiocianati	-NH ₂ -SH -OH	7	Galactozidaza A

1	2	3	4
Bis-η-nitrofenilesterii acizilor dicarboxilici $\text{O}_2\text{N}-\text{C}_6\text{H}_4-\text{OOC}(\text{CH}_2)_n\text{COO}-\text{C}_6\text{H}_4-\text{NO}_2$	-NH ₂	7	Insulina
Bis- hidroxisuccinimido-esterii acizilor dicarboxilici	-NH ₂ -SH -OH	7	Insulina
Disulfonil-cloruri aromatice ca: 	-NH ₂	7	
Aril-halogenuri difuncționale ca: 1,5-difluoro-2,4-dinitro-benzen:  p,p'-difluoro-m,m'- dinitrodifenilsulfona: 	-NH ₂ (OH fenolic)	7 - 10	Gliceraldehid-fosfat-dehidrogenaza; Lizozima; Lipoproteine de densitate inaltă

1	2	3	4
Bis-maleinimida: 	-SH	7 - 8	
Bis-halocetone	-NH ₂ -SH R-S-CH ₃ ; imidazol	5 - 9	Papaina, bromelaina
Bis-diazocetone	-COOH	Interval mare	Pepsina, lisina

- p-nitrofenil-cloracetatul:



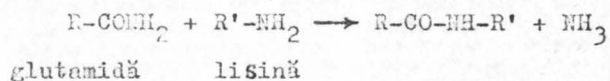
care reacționează cu grupările nucleofile din moleculele proteinelor.

De asemenea se mai folosește un agent polifuncțional foarte reactiv; 4-triclorotriazina (clorura de cianuril), atât pentru rețiculări cât și pentru legarea enzimelor pe suporturi insolubile.

Prin condensarea intramoleculară a grupărilor funcționale grefate pe lanțuri peptidice apropiate se pot forma legături încrucigate. Astfel, grupele -COOH de pe un lanț peptidic pot reacționa cu grupări -NH₂ de pe lanțul alăturat (paralel), conducând la grupări amidice; grupele COOH pot reacționa cu grupele -OH

obținându-se o reticulare intramoleculară prin grupări esterice etc.

Pentru a provoca reticularea intramoleculară se folosesc agenți de condensare ca: carbodiimide (Means și Feeney 1971); N-N-carbonilimidazolul (Paul și Anderson, 1960), etc. Procedeu cel mai simplu și mai atractiv pentru reticulări intramoleculare folosește transglutaminaza, care catalizează reacția de tipul:



Enzima se poate extrage din serum și din ficatul de porc, ca și din celulele roșii. Utilizarea sa este limitată de specificitatea redusă la un număr mic de resturi glutamidice din câteva proteine, nefiind selectivă față de sursa de grupări $-NH_2$.

Una dintre cele mai importante aplicații ale reticulării intramoleculare este investigarea structurii tridimensionale a proteinelor globulare în soluție.

În scopul măsurării distanței dintre două resturi reticulate din lanțul polipeptidic, se utilizează reactivi difuncționali.

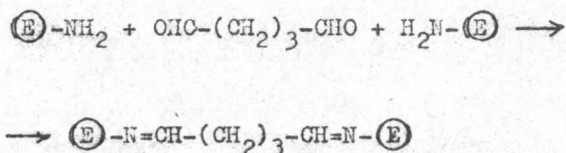
Deși investigarea cu raze X este mult mai completă, se preferă pentru determinarea schimbărilor conformaționale din cursul acțiunii biologice a proteinelor această metodă cu reactivi difuncționali. În acest fel se pot investiga: arhitectura moleculară a proteinelor oligomere, a complexelor multiproteinice și a unor structuri complexe ca ribozomii și membranele.

În concluzie, se poate spune că cel mai important rezultat obținut în urma reticulării intramoleculare este stabilizarea unor proteine biologice active față de diverse condiții de denaturare, inclusiv distrugerea lor „in vivo”.

I.2.3.2. Reticularea intermoleculară

Principiul metodei constă în formare de legături covalente între moleculele enzimei și reactiv, rezultând un produs tridimensional, reticulat.

În ordine istorică, primul agent de reticulare utilizat pentru insolubilizarea enzimelor a fost glutaraldehida, care formează punți azo-metinice (baze Schiff) prin condensarea cu grupările -NH_2 libere din enzimă:



Acest agent conduce la cele mai satisfăcătoare și reproductibile rezultate, agregarea (reticularea) necesitând condiții blânde de reacție.

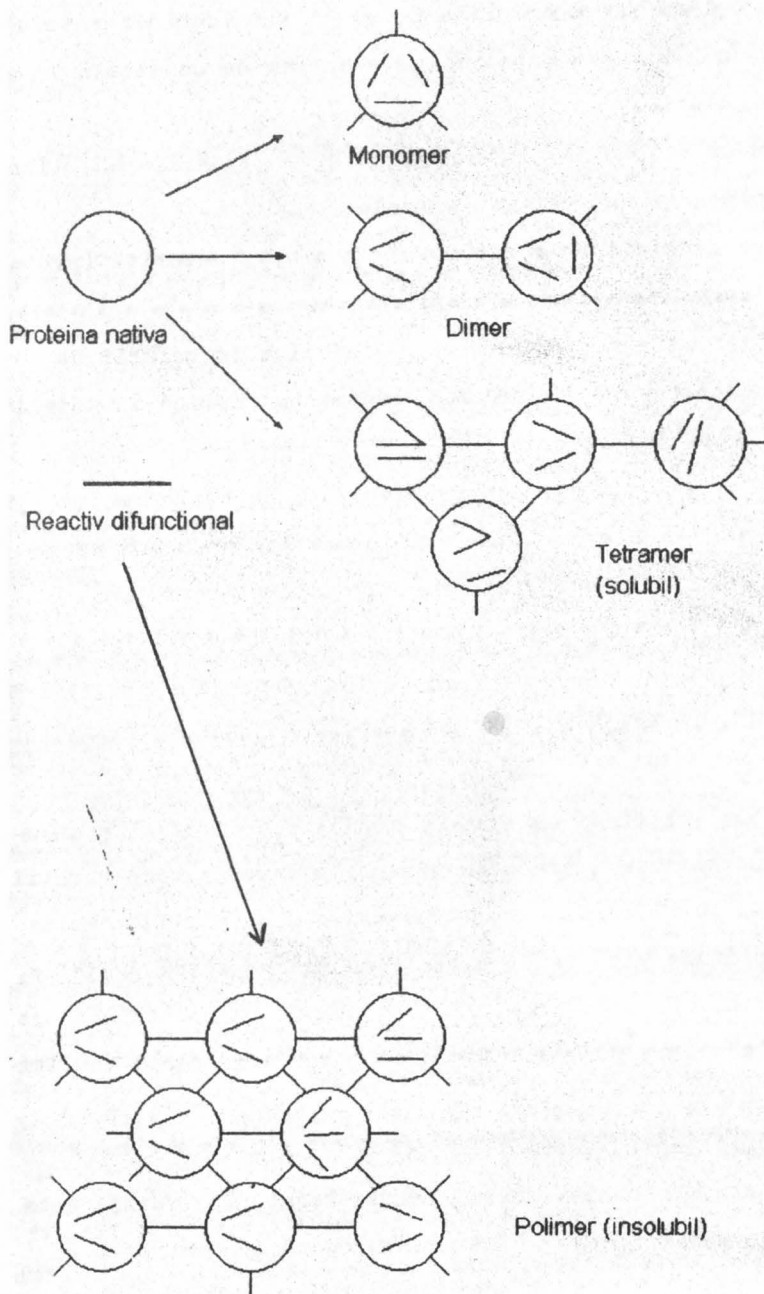
În fig. nr.14 este reprezentată schematic reacția unei proteine native cu un agent difuncțional. În funcție de condițiile de lucru se pot obține: monomeri, dimeri, trimeri sau oligomeri solubili în apă, sau un polimer insolubil.

Reacția cu agentul difuncțional conduce la legături încrucișate intra- și intermoleculare, incluzând doar o parte a moleculei în timp ce restul poate rămâne nemodificat sau poate fi transformat într-o grupare nereactivă, prin acțiunea moleculelor de solvent.

Insolubilizarea enzimelor în reacțiile de reticulare depinde de: raportul cantităților proteină/agent de reticulare, pH-ul și tăria ionică a soluției, temperatură și timpul de contact.

Fig. nr.14

Schema reticulării intermoleculare cu un agent difuncțional



În 1969, Jansen și Olson au observat că insolubilizarea papainei cu glutaraldehidă crește cu creșterea pH-ului soluției, insolubilizarea completă având loc timp de 24 ore la 0°C, la pH = 5,2-7,2 și cu un raport procentual glutaraldehidă/proteină = 2,3/0,2. Insolubilizarea papainei este extrem de sensibilă la acțiunea temperaturii.

Studiindu-se reacția glutaraldehidei cu grupările-NH₂ libere din proteine s-au constatat următoarele:

- o mare stabilitate a agregatului format, datorită (probabil) tăriei legăturii azometinice;

- reactivitatea mai scăzută a proteinelor în soluții de glutaraldehidă proaspăt distilată, ceea ce nu explică în totalitate mecanismul reacțiilor care au loc.

Lucrând cu soluții diluate de proteine, se obțin la început oligomeri solubili în apă. Cu soluții concentrate de enzime se obțin rapid polimeri insolubili, cu masă moleculară înaltă.

Si natura proteinei influențează reacția de reticulare. Astfel, proteinele cu conținut mare de lizină se insolubilizează rapid, reticularea fiind maximă în apropierea punctului izoelectric.

Alt factor important este pH-ul mediului, mai ales la insolubilizarea proteinelor sărace în lizină, aflate în concentrații relativ joase. În asemenea cazuri, pentru a insolubiliza enzima aflată în cantitate mică este necesară adăugarea altei proteine, bogată în lizină. În acest caz, glutaraldehida va reticula între ele moleculele celor două proteine. Dacă proteina bogată în lizină se adaugă în cantități mari, ea poate fi considerată ca un suport insolubil pentru enzima.

Astfel, serum albumina bovină foarte bogată în lizină, este utilizată frecvent ca proteină auxiliară. Când concentrația sa

este > 50 mg/ml, insolubilizarea are loc rapid la $\text{pH} = 5-7$.

Glutaraldehida mai poate fi folosită și pentru a lega proteina de un suport ce conține grupe NH_2 libere (cap I.2)

Reticularea se mai folosește și pentru a reține proteinele pe suprafața unui material poros (la „ancorarea” proteinei pe suport). Masa insolubilă a agregatului reticulat rămâne depusă pe suport, dacă este legată covalent de el. În cazul unui suport cu puțini centri. reactivi sau de pe care enzima se poate desprinde ușor, este de dorit ca agregarea (reticularea) să fie combinată cu legarea covalentă a enzimei pe suport. Astfel, într-o primă etapă enzima se leagă de suport, iar în etapa următoare se adaugă glutaraldehida și o nouă cantitate de enzimă.

Agregarea se mai poate utiliza concomitent cu includerea, pentru a crește proporția de enzimă inclusă într-un gel sau într-o microcelulă sintetică. În produsele obținute gelurile vor avea pori mai mari, reducându-se astfel efectele difuziei.

Microcelulele ca și suporturile se pot reticula pentru a reduce dimensiunile porilor, dar aceasta face ca uneori enzimele incluse să fie eliberate în soluție.

Conjugate insolubile pot fi obținute prin tratarea unei enzime în stare solidă cu o soluție a agentului difuncțional. Metoda are avantajul prezervării activității biocatalitice, legăturile încrucigate formându-se în întreaga masă a cristalului de enzimă și nu numai la suprafață. Agregate enzimatice reticulate pot fi obținute și după microencapsularea enzimei. Astfel, catalaza a fost întâi encapsulată și apoi reticulată prin tratare cu glutaraldehidă.

O variantă interesantă a metodei de reticulare mixtă (enzimă - proteină auxiliară) este prepararea unor particule sferice de enzimă - proteină prin copolimerizarea în emulsie a enzimei,

proteinei și agentului de reticulare. În acest caz, enzima și proteina împreună cu agentul de reticulare se dispersează în apă, după care amestecul obținut este adăugat rapid, prin agitare energică, la un solvent nemiscibil cu apa, care conține un emulgator pentru emulsii apă în ulei. După reticulare și înlăturarea agentului difuncțional (care poate solubiliza perlele de proteină) particulele de reticulat se transferă în faza apoasă.

Reticularea poate fi făcută și după adsorbția proteinei pe un suport insolubil în apă. Dacă suportul este neperos, rezultă un strat superficial de conjugat enzimatic; în cazul suporturilor perease, conjugatul insolubil le impregnează. Astfel, straturi adsorbite superficial se obțin cu silice coloidală sau cauciuc Silastic, pe când produse impregnate se pot prepara pe membrane de celodiu perease. În acest fel se imobilizează papaina pe celodiu.

În mod asemănător, se poate imobiliza și Penicilin-6-acilaza (PGA), utilizată pentru semisinteza penicilinelor ca și pentru scindarea racemicilor de derivați fenilacetilați ai carnitinei și aspartanului. De asemenea, PGA este utilizată pentru catalizarea unor reacții de protecție/deprotecție în chimia zaharurilor și aminoacizilor.

Datorită importanței sale majore pentru obținerea medicamentelor de semisinteză, recent, J.M.Guizán și colaboratorii au elaborat o metodă de reticulare a PGA cu formaldehidă pe agareză. Metoda reduce riscul distorsionărilor conformaționale ale enzimei prin imobilizare și protejează centrul activ al biocatalizatorului, prevenind îndepărtarea grupărilor reactive ale acestora la contactul cu solvenții organici. Dat fiindcă formaldehida asigură un singur punct de legătură între enzimă și suport, se folosește în cantitate mai mare. Se obțin astfel derivați PGA-agaroză mai stabili

termic, deși activitatea catalitică scade datorită excesului de CH_2O . Reticularea se face la $\text{pH} = 7-7,5$.

Deoarece glutaraldehida a fost și a rămas cel mai atractiv agent de reticulare a enzimelor, în cele ce urmează se vor trece în revistă principalele metode de lucru folosite în cazul acestui agent difuncțional.

Imobilizarea cu glutaraldehidă necesită pentru multe enzime o metodă generală, schimbând doar condițiile de lucru în funcție de rezultatul urmărit. Se iau în considerare următorii factori:

- 1) Natura enzimei;
- 2) Proprietățile fizico-chimice ale suportului;
- 3) Densitatea și distribuția centrilor activi din enzimă;
- 4) Activitatea enzimatică inițială și variația sa în timp;
- 5) Stocarea și condițiile de utilizare a agregatului reticulat.

I.2.3.3. Tehnici de reticulare

În funcție de tehnica aplicată se pot obține agregate formate din:

- a) enzime pure;
- b) enzimă și o proteină inertă (co-reticulare);
- c) membrane sau particule poroase;
- d) enzime reticulate într-un gel sintetic sau natural (de acrilamidă, celofan, agaroză etc.).

a) Insolubilizarea enzimei pure cu glutaraldehidă

În acest scop, la o soluție apoasă tamponată de enzimă se adaugă în picături o soluție apoasă de glutaraldehidă, sub agitare blândă.

Pentru definitivarea reacției amestecul se mai lasă la $+4^{\circ}\text{C}$ 1-3 ore. În funcție de natura enzimei, gelul insolubil apare după 10-30 minute. Gelul format se spală prin dispersare în apă distilată, până la îndepărtarea totală a urmelor de proteină și a aldehidei nereacționate. Se păstrează în apă distilată la frigider.

Rezultatele cele mai bune se obțin cu chimotripsină.

b) Insolubilizarea enzimelor prin co-reticulare cu proteine inerte (auxiliare)

Uneori, imobilizarea directă cu glutaraldehidă prezintă unele dezavantaje ca:

- excesul de agent de reticulare poate acționa și asupra grupelor $-\text{NH}_2$ din situsul reactiv al enzimei;

- se pot obține structuri compacte pseudocristaline, care prezintă împiedicări sterice multiple;

- o reticulare excesivă poate împiedica adaptarea conformațională a enzimei și substratului, ceea ce duce la inactivarea moleculelor de biocatalizator.

Prezența unei proteine inerte permite utilizarea unor concentrații mai mari de enzime pentru imobilizare, reducându-se dezavantajele amintite.

Cele mai bune rezultate se obțin prin agregarea enzimelor pe suprafața unei proteine inerte. În acest scop, cea mai convenabilă este serum albumina bovină (BSA), o proteină solubilă, accesibilă comercial în diferite grade de puritate. Nu este recomandabilă pentru imobilizarea enzimelor proteolitice, care în urma proteolizei se desprind din agregat.

Se mai folosesc drept proteine inerte: hemoglobina, ovalbumina, fibrinogenul.

Se pot obține atât geluri cât și membrane, astfel:

- Gel proteinic se poate obține dintr-un amestec de glucooxidază din *Aspergillus niger* și BSA prin dispersare într-o soluție apoasă tampon de glutaraldehidă la pH = 5, la +4°C, timp de câteva ore. Gelul se spală apoi cu apă distilată, cu soluție de lizină și se păstrează în frigider, în apă distilată.

- Membrană proteinică se obține astfel:

Se adaugă enzima (exemplu, catalaza) la o soluție apoasă - tampon de BSA, la pH = 6,8. La amestecul format se adaugă o soluție apoasă de glutaraldehidă 2,5% până la o concentrație finală de 0,7%.

Când vâscozitatea amestecului începe să crească, soluția se întinde uniform pe suprafața unei plăci de sticlă. După 12 ore de păstrare la 20°C, se formează o membrană, care se mărunțește și se spală prin agitare blândă cu apă distilată și cu o soluție de lizină. Se păstrează în frigider. Pentru a preveni contaminarea microbiană, în ultima apă de spălare se adaugă o cantitate mică de azidă de sodiu.

- Particule proteice poroase în stare de pulbere

Agregarea enzimelor la rece cu o proteină inertă prin intermediul glutaraldehidei conduce la structuri poroase; în porii elastici ai particulelor are loc o difuzie favorabilă a substratului și produsului, materialul putând fi utilizat în coloane sau în reactoare cu pat compact. De exemplu:

- Imobilizarea β -galactozidazei din *Escherichia coli* în particule poroase

O soluție tamponată (la pH = 6,8) de β -galactozidază se amestecă cu BSA și cu glutaraldehidă. Amestecul este agitat la -30°C pentru dispersarea gelului, după care se lasă să ajungă treptat la +4°C. După 4 ore se obține un copolimer proteinic spongios, care se spală cu apă, cu soluție de lizină și iar cu

apă și se liofilizează. Agregatul format se pisează. Se obține o pulbere care se suspendă în soluție tampon și se poate utiliza fie în reactor, „batch” fie într-un reactor-coloană.

c) reticularea moleculelor de enzimă în interiorul porilor suportului (reticulare după închidere în pori)

Pentru prima oară această metodă a fost utilizată la imobilizarea papainei pe foi de colodiu (Goldman și colaboratorii, 1965).

Molecula de enzimă, care într-o oarecare măsură difuzează în porii unui suport hidrofili (colodiu, celofan, celuloză) sau hidrofob (teflon poros, silicon, sticlă poroasă) poate fi insolubilizată în porii suportului.

Astfel, proteina se „ancorează” în pori fără a fi necesară o reacție chimică între suport și agentul de reticulare.

În acest fel se poate imobiliza de exemplu un sistem de trei enzime secvențiale (β -glucozidaza, glucozooxidaza și catalaza) pe foi de celofan (de proveniență comercială).

Foile de celofan bine spălate se impregnează cu un amestec de β -glucozidază + glucozooxidaza și catalază în proporție 1:1:5 (U.I.). Foile impregnate se întind pe plăci de sticlă și se usucă în frigider. Preparate cu activitate mărită se obțin după câteva impregnări succesive.

Foile uscate se impregnează apoi cu o soluție tampon de glutaraldehidă la pH = 6,8 și se repetă uscarea la +4°C, urmată de spălarea foilor cu apă distilată și soluție tampon.

În tabelul nr.22 se face o comparație între activitatea unor enzime reticulate după exemplele: b) (membrane) și c) (particule poroase).

Tabelul Nr. 22

Activitatea unor agregate de enzime reticulate cu
glutaraldehidă

Enzima	Activitate biocatalitică (%)	
	In materialul poros (ex. c)	Cu proteină au- xiliară (co-re- ticulare)(ex. b)
1	2	3
<u>1. Oxidoreductaze</u>		
Glucozooxidaza	10 (celofan)	80 Alb
Urat-oxidază	5 (celofan)	30 Alb
L-aminoacid-oxidază	-	50 Alb
Xantin-oxidaza	-	60 Alb
Catalază	5 (C activ)	80 Alb
Peroxidază	5 (Hârtie Watman)	60 Alb
Alcool-dehidrogenaza	-	2 56 ^x) Alb
Lactat-dehidrogenaza	-	5 43 ^x) Alb
Gluco-6-fosfat-dehidrogenaza	-	5 Alb
<u>2. Transferaze</u>		
Hexokinaza	3 (Hârtie aminată)	30 Alb
Ribonucleaza	-	30 ^x) Alb
Piruvat-kinaza	-	15 Alb
Fosfofructo-kinaza	-	10 Alb
<u>3. Izomeraze</u>		
Gluco-6-fosfat-izomeraza	5 (Particule de foi de silicon)	50 Alb
Triozo-fosfat-izomeraza	-	50 Hb

Alb = albumină

Hb = hemoglobină

1	2	3	
4. <u>Liaze</u>			
Anhidraza carbonică	5 (folie de silicon)	-	-
Trirosin-decarboxilaza	-	50	Alb
Fenilalanin-decarboxilaza	-	60	Alb
Arginin-decarboxilaza	-	50	Alb
Lizin-decarboxilaza	-	40	Alb
5. <u>Hidrolaze</u>			
α -Amilaza	2 (Mătase)	80 [⊗]	Alb
β -Galactozidaza	-	50 80 [⊗]	Alb
Tripsina	3 (Celofan)	-	-
Chimotripsina	30 (Celofan)	-	-
Ureaza	-	60	Alb
Asparaginaza	-	30 [⊗]	Alb
β -Glucozidaza	-	20	Alb

Semnul [⊗]) indică faptul că reticularea într-o structură poroasă, spongioasă are ca rezultat o creștere a activității față de metoda simplei imobilizări pe suprafața suportului.

În toate cazurile indicate în acest tabel se observă că preparatele reticulate ca în exemplul b) (prin formare de membrane din co-reticulatul cu enzime auxiliare) au o activitate biocatalitică mult mai mare decât cele obținute prin exemplul c) (reticulare pe pelicule poroase).

Din acest tabel se poate observa că metoda utilizării de proteine inerte la co-reticularea enzimelor sub formă de membrană este o metodă mai recomandabilă pentru obținerea unor aducți cu activitate enzimatică remanentă mai mare.

d) Includerea într-un gel a moleculelor de enzimă solubilă reticulată

O stabilitate operațională superioară a enzimei se obține prin agregarea sa înainte de includerea într-un gel insolubil. Se previne astfel posibilitatea enzimei de a se desprinde de pe suport după includere.

De exemplu, s-a reticulat ureaza înainte de includerea într-un gel de poliacrilamidă-agaroză.

În prima etapă, moleculele enzimei dintr-o soluție apoasă tampon la pH = 6,8 se reticulează cu o soluție de glutaraldehidă la 4°C. După 10 ore reticularea se întrerupe prin adăugarea unei soluții de glicină.

A doua etapă constă în includerea propriu-zisă. Pentru aceea se amestecă o soluție de acrilamidă și BIS cu soluție de enzimă reticulată. Amestecul se încălzește la 37°C (soluția A).

Separat, se fierbe 5 minute un gel apos de agaroză, după care se răcește, sub agitare la 40°C (soluție B).

La soluția B se adaugă KMSD, persulfat de sodiu și se amestecă cu soluția A.

Masa obținută se întinde prin pulverizare uniformă pe o placă de sticlă. Polimerizarea durează 30 minute la 4°C. Gelul este apoi mărunțit în apă distilată și spălat bine. Preparatul rămâne activ câteva săptămâni dacă se păstrează la 4°C. Porozitatea sa înaltă permite o difuzie suficientă a ureei și a produșilor de reacție. Dacă enzima nu se reticulează înainte de a fi adăugată la gelul de acrilamidă, activitatea sa scade repede prin desprindere de pe suport.

I.2.3.4. Factorii care influențează activitatea agregatelor de enzime reticulate

Indiferent care mod de imobilizare prin reticulare se alege trebuie să se țină cont de câțiva factori importanți pentru activitatea reziduală a enzimei din preparatul obținut și anume:

1°. Alegerea agentilor de reticulare care conțin grupări funcționale capabile de a reacționa în condiții blânde. Se exclud reacțiile care necesită valori extreme ale pH-ului și solvenți nepolari. Se preferă agenți care asigură o distanță moleculară bună între moleculele reticulate și din acest punct de vedere este recomandată glutaraldehida.

2°. Alegerea condițiilor reacției de reticulare

trebuie excluse condițiile care pot produce o denaturare a moleculelor proteice.

De aceea se lucrează la temperaturi joase, în soluții tamponate (în jur de pH neutru), cu suporturi hidrofobice și solvenți, printr-o agitare moderată. Reacția de reticulare trebuie stopată după un timp pentru a preveni obținerea de preparate instabile, ca și reacțiile secundare (se fac spălări cu soluții de lizină sau glicină).

3°. Modificările în tehnica de agregare au ca scop protejarea enzimei de denaturare. Pentru aceasta se pot adăuga proteine inerte, sau se preferă reticularea sub formă de particule poroase.

Creșterea vitezei de reacție după imobilizare poate fi obținută prin adăugare de substrat (lactoză pentru β -galactozidază sau urat pentru urat-oxidază) sau de coenzimă (NAD pentru alcool-dehidrogenază). În unele cazuri grupele -SH trebuie protejate (de exemplu: prin complexarea cu Hg a papainei).

4°. După reticulare, moleculele de enzimă se stabilizează în general față de denaturare, ceea ce permite în unele cazuri utilizarea preparatului obținut și în condiții mai drastice (solvenți nepolari, temperaturi mai ridicate cu câteva grade).

5°. Insolubilizarea prin reticulare este favorizată de condițiile care se folosesc pentru agregarea fizică a proteinelor ca: concentrații ridicate de proteine, concentrații mici de săruri ionizabile, apropierea de punctul izoelectric, care facilitează insolubilizarea.

La folosirea glutaralhidei, randamentul este maxim pentru concentrații determinate. Astfel cu concentrații mai joase de 2,5% de glutaralhidă (0,25%) și cu soluții concentrate de proteine, nu se produce insolubilizarea. Crescând concentrația de glutaralhidă se observă că enzima este parțial imobilizată; viteza de imobilizare crește până la un maxim, după care apare un palier. Peste acest palier, creșterea concentrației de glutaralhidă duce la insolubilizarea mai rapidă, dar activitatea enzimei imobilizate descrește. Aceasta se datorează probabil atât creșterii împiedicării difuziei, cât și denaturării enzimei printr-o reticulare prea avansată. Domeniul optim depinde de natura enzimei și de metoda de reticulare.

6°. Concentrația proteinei influențează atât cinetica reticulării cât și textura agregatului obținut.

Astfel, concentrații mari de proteină conduc la compactarea rapidă a particulelor (tasare).

Concentrații mari de proteină produc deci creșterea împiedicării difuziei și determină o rapidă descreștere a activității enzimei imobilizate.

7°. Metodele de determinare a activității enzimei imobilizate sunt cele folosite în general pentru enzimele libere (solubile):

titrimetrice, polarografice, fotometrice, gravimetrice etc.

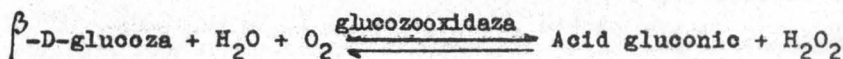
8°. O solubilizare parțială sau o desprindere a enzimei de pe agregat face ca proteina să treacă întâi în supernatant și apoi în efluent.

Se poate verifica prin teste caracteristice prezența enzimei în efluent. Se pot utiliza în acest scop metode rapide de dozare fotometrică (colorimetrică) a cantității de enzimă din efluent ca:

- pentru fosfataza alcalină se dozează p-nitrofenolul format prin acțiunea asupra p-nitrofenilfosfatului (colorație galbenă la $\lambda = 410 \text{ nm}$);

- pentru invertază se folosește ca substrat zaharoza în prezența acidului dinitrosalicilic, la $\lambda = 540 \text{ nm}$, (acidul dinitrosalicilic dă o colorație roșie cu fructoza);

-glucozooxidaza se dozează folosind ca substrat β -D-glucoză:



H_2O_2 se dozează cu cromogeni în prezența peroxidazei:



DH_2 poate fi: orto-anisidina; 2,6-diclor-indofenol, 4-aminofenazonă etc.

9°. Activitatea biocatalitică a conjugatelor de enzime reticulate, insolubile în apă poate varia aproape imprevizibil, fiind dependentă de: cantitatea de agent de reticulare, pH, tărie ionică etc.

- Influența pH-ului în cazul activității conjugatelor enzimice a fost studiată de Goldman și colaboratorii, începând din 1968. Ea depinde și de natura substratului, pentru unele fiind

maximă până la pH $\sim$ 9, pentru altele pH-ul optim fiind de 3-6. În unele cazuri, curbele activității biochimice în funcție de pH depind și de natura produsilor de reacție, ca și de parametrii cinetici ai reacției.

- Specificitatea biocatalizatorilor se modifică uneori în urma reticulării; catalaza insolubilizată cu glutaraldehydă prezintă o diminuare a activității sale peroxidazice, mărirea acesteia descreșteri depinzând de substratul utilizat. Astfel, activitatea peroxidazică descrește de 11 ori față de metanol și de 80 ori față de pirogalol (datorită îngreunării accesibilității substratului la centrul reactiv al enzimei și probabil, datorită unor modificări conformaționale ale enzimei reticulate). În schimb specificitatea enzimei imobilizate și a celei libere este identică față de substraturi ca: cianuri, hidroxilamină și amino-triazol.

- Stabilitatea termică a enzimelor reticulate insolubile în apă poate fi mai mică sau mai mare decât a enzimei libere.

Astfel glucozooxidaza impregnată în foi de celofan și reticulată cu glutaraldehydă, are o stabilitate termică superioară, la 37°C.

Din contră, papaina impregnată (sub formă de trei straturi) și reticulată în același mod are o termostabilitate mai mică în intervalul 65-80°C față de enzima liberă.

- Stabilitatea la acțiunea pH-ului a membranelor cu papaină reticulată este similară cu cea a enzimei libere la pH = 6-10 și mai mare la pH < 6. Astfel, în timp ce papaina liberă (solubilă) își păstrează doar 10% din activitatea sa biocatalitică la pH=2, membranele de colodiu cu papaină reticulată indică o valoare de 50% a activității remanente la același pH.

- Stabilitatea la stocare depinde în mare măsură de natura

enzimei. Astfel, preparatele de papaină reticulată cu glutaraldehydă au o stabilitate mult mai mare, după două săptămâni de stocare la 4°C, decât catalaza imobilizată prin același procedeu.

Agregatele obținute prin reticularea enzimelor se pot folosi în cromatografia de afinitate, la prepararea senzorilor enzimatici, sau în bioreactoare cu pat fluidizat pentru prelucrarea unor materiale biologice active etc.

I.2.4. Imobilizarea enzimelor prin legare covalentă pe suporturi anorganice

Caracteristicile materialelor anorganice joacă un rol important în alegerea suportului corespunzător imobilizării fiecărei enzime.

Pentru utilizarea acestui tip de suporturi se iau în considerație mai mulți factori:

- morfologia porilor suportului;
- posibilitatea enzimelor de a se imobiliza pe asemenea suporturi;
- dacă enzima imobilizată este rezistentă în medii bazice, acide sau cu salinitate înaltă;
- ușurința de manipulare a suportului;
- dacă suportul poate suferi compresii;
- care este presiunea maximă de scurgere adecvată sistemului respectiv utilizat în reactoare;
- ce influențe au dimensiunile și forma particulelor suportului;
- care este perioada de înjumătățire a sistemului ($t_{1/2}$ = perioada de timp în care activitatea inițială a enzimei se reduce la jumătate);

- cum este influențată perioada de injumătățire de temperatură, pH și alți parametri;

- în ce condiții se poate stoca preparatul etc.

Corelând toate aceste considerente se poate alege pentru o anumită enzimă cel mai convenabil suport.

Suporturile anorganice (mai ales sticlele și ceramicile poroase) prezintă avantaje ca: rezistență mecanică mare, rezistență crescută la acțiunea solvenților și microorganismelor, manipulare ușoară și posibilități de recuperare și reutilizare a suportului.

Studii de laborator au arătat că între sticla poroasă și ceramicile poroase există deosebiri fizice foarte mari. În general, suporturile ceramice sunt mai stabile în timp decât sticla.

Apoi, pentru fiecare enzimă în parte există o dimensiune optimă a porilor materialelor. Astfel, între diametrul porilor și aria suprafeței este o relație inversă: materiale cu diametre ale porilor foarte mici trebuie să aibă o suprafață cât mai mare pentru a lega optim o cantitate cât mai mare de enzimă.

Se pot prepara sticle poroase cu orice dimensiuni ($\emptyset$) ale porilor, între 30-2.000 Å.

Si dimensiunile particulei au un impact major asupra activității unei enzime imobilizate.

Cu cât particula de suport este mai mare, cu atât mai mare este și efectul de difuzie. În general, activitatea enzimei crește cu reducerea dimensiunilor particulei. Se recomandă alegerea unor particule cât mai mici, care favorizează o creștere a presiunii de scurgere prin patul de material enzimatic; suprafața optimă a particulelor de sticlă poroasă este de aproximativ $40 \text{ m}^2/\text{gm}$.

Am văzut în cap. I.4 că enzimele pot fi imobilizate pe suporturi anorganice prin tehnica adsorbției, fără a fi legate

covalent de acestea.

Imobilizarea covalentă necesită în principiu, ca și pentru suporturile organice, o activare chimică prealabilă a suportului.

Suportul de sticlă silicioasă se pregătește înainte de activarea chimică printr-o spălare acidă (cu HNO_3 5%) la $80-90^\circ\text{C}$, timp de 60 minute, urmată de dispersare în apă distilată care în același timp spală și hidratează suprafața suportului.

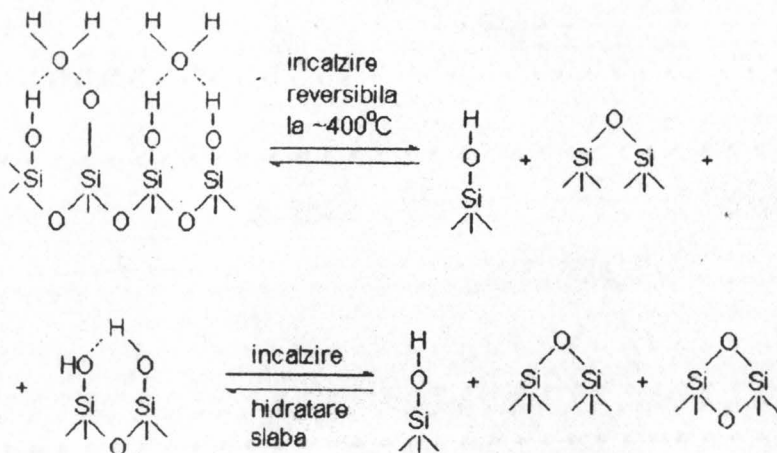
Se utilizează și sticle borosilicioase care prin tratament la $500-700^\circ\text{C}$ capătă pori de dimensiunile necesare. Tratamentul termic al sticlei poroase cu B_2O_3 conduce la obținerea unui suport cu diametrul porilor (ϕ) = $30-75 \text{ \AA}$, volumul porilor reprezentând 28% din volumul total al materialului.

O sticlă borosilicioasă cu pori mari se obține dacă după tratamentul termic se tratează cu un agent de bazicitate medie, care lărgeste porii prin îndepărtarea reziduurilor silicioase din interiorul acestora.

Controlând condițiile chimice și fizice de tratare a sticlei utilizată ca suport, se pot obține materiale cu o extrem de variată gamă a dimensiunilor porilor.

Sticlele poroase prelucrate pentru imobilizarea enzimelor conțin la suprafață grupări OH, având o aciditate slabă, ceea ce explică adsorbția puternică a unor compuși bazici.

Studiul spectrelor IR ale sticlelor poroase proaspăt preparate și a celor deshidratate la $100-500^\circ\text{C}$ a permis clarificarea procesului de deshidratare-hidratare care are loc pe suprafața lor:



După pregătirea prealabilă a suportului este necesară de obicei activarea sa chimică, pentru a putea reacționa cu grupările reactive libere din moleculele enzimelor.

Metodele de activare au ca scop, ca și în cazul suporturilor organice, plasarea pe suportul anorganic a unor grupări funcționale reactive. Activarea materialelor anorganice se face fie în prezența, fie în absența agenților de silanizare pe baza reacției grupărilor OH de pe suprafața suportului.

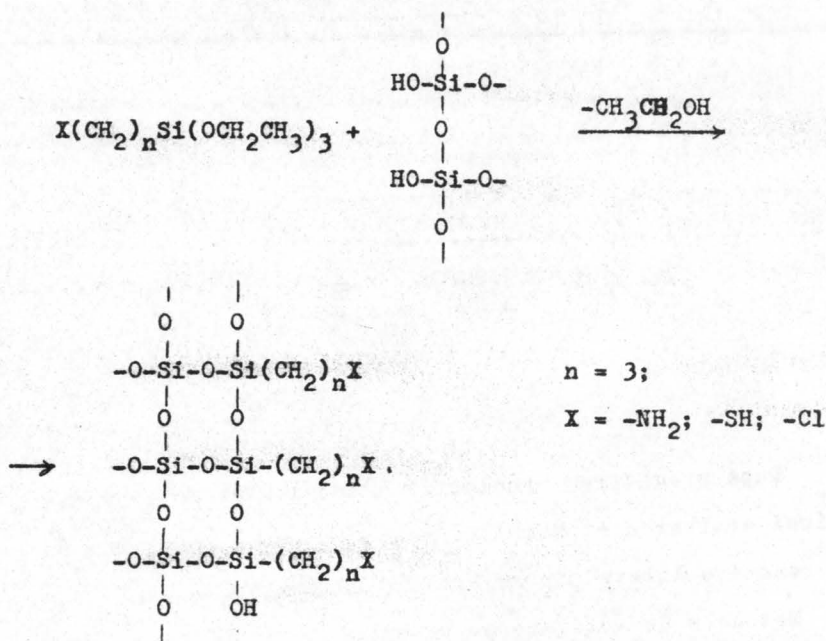
I.2.4.1. Tehnica activării silanice

1°. Activarea alchil-aminosilanică a suprafeței suporturilor anorganice se poate face în mediu apos sau neapos

1°a. Silanizarea apoasă

Această metodă are ca scop cuplarea pe suprafața suportului a unui strat monomolecular de silan (fig. nr. 15):

Fig. nr.15



De exemplu, la suportul anorganic spălat se adaugă o soluție apoasă de γ -aminopropiltrietoxisilan, după care se ajustează pH-ul la 3-4. Reacția de activare are loc la 75°C, 2 ore, după care suportul activat este filtrat la vid, spălat cu apă distilată și uscat la 115°C, minimum 4 ore.

1^ob. Silanizarea organică

Prin această variantă se leagă o cantitate mai mare de rest alchilaminic ($X = -NH_2$) pe suprafața suportului, decât în silanizarea apoasă. Suportul obținut este totuși mai puțin stabil.

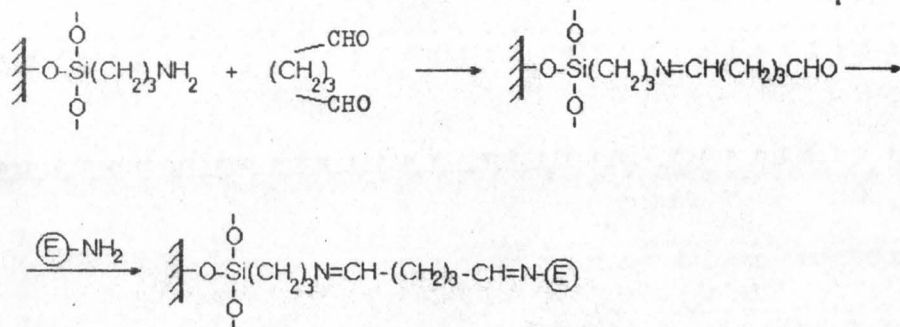
Metodica activării este asemănătoare cu cea apoasă, cu deosebirea că se folosește γ -aminopropiltrietoxisilan în toluen sau în acetonă.

2°. Cuplarea enzimelor cu alchil-aminosilanoderivații suportului (X = $-\text{NH}_2$ din fig.nr.15)

După activarea chimică suportul conține pe suprafață grupări NH_2 libere, care se pot cupla cu enzimele prin una din metodele cunoscute de la imobilizările pe suporturi organice:

- Cuplarea prin intermediul bazelor Schiff

Pentru aceasta se utilizează glutaraldehida, metoda fiind simplă și rapidă. Este necesar să se îndepărteze tot excesul de aldehydă pentru a se evita reticularea enzimei. Această reticulare poate duce la scăderea activității reziduale a enzimei prin blocarea porilor, împiedicându-se astfel accesul unor molecule mai mari de substrat:



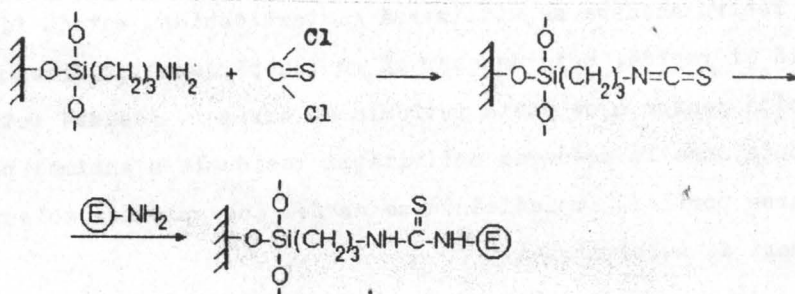
Recent, G.Jian și colaboratorii au imobilizat glucooxidaza și peroxidaza din hrean pe sticlă poroasă alchilaminică, în prezența glutaraldehydei; reacția are loc la 80°C , timp de 5-6 ore, în acetonă, cu concentrații mici de glutaraldehidă (0,1% pentru glucooxidază și 2,5% pentru peroxidază).

Glucooxidaza se imobilizează la $\text{pH} \sim 6,5$ în tampon fosfat, iar peroxidaza la $\text{pH} = 10$, în tampon carbonat. Dat fiindcă în mediu alcalin legătura azometinică este instabilă, stabilitatea

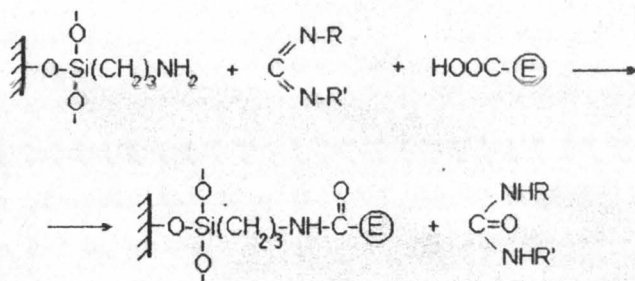
aductului cu peroxidaza se asigură prin reducerea acestei grupări cu NaBH_4 .

- Cuplarea prin intermediul izotiocanaților

Derivatul aminoalchilat al suportului se tratează cu tiofosgen:



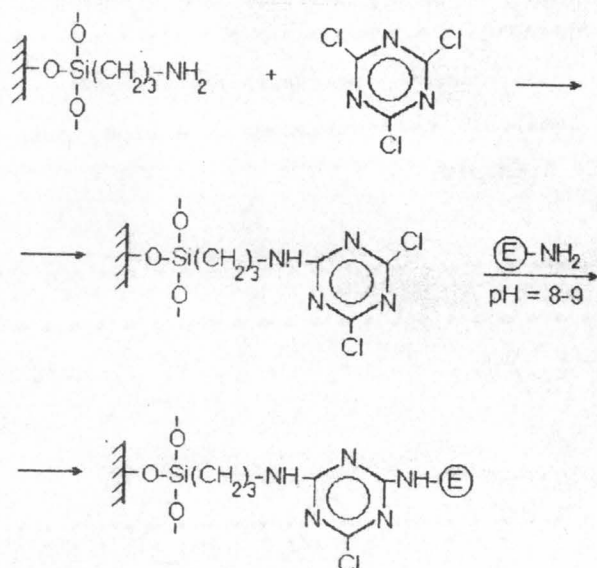
- Cuplarea cu carbodiimide se utilizează pentru imobilizarea pepsinei la pH acid:



Este o metodă rapidă și are loc într-o singură etapă. Se preferă un derivat al grupei -OOH (ester, clorură acidă) a

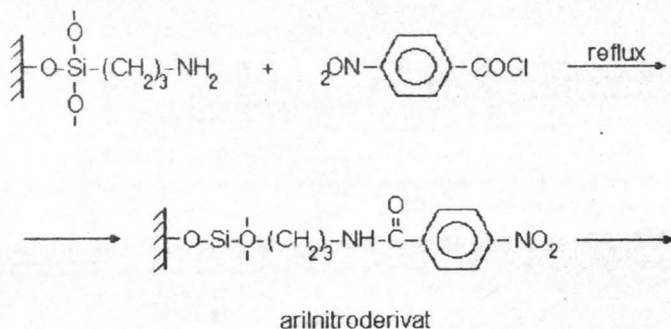
enzimei pentru a se evita reticularea.

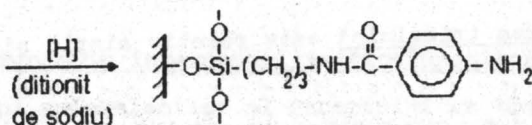
- Cuplarea triazinică este relativ simplă și mult folosită:



- Introducerea unor grupări aril-aminice

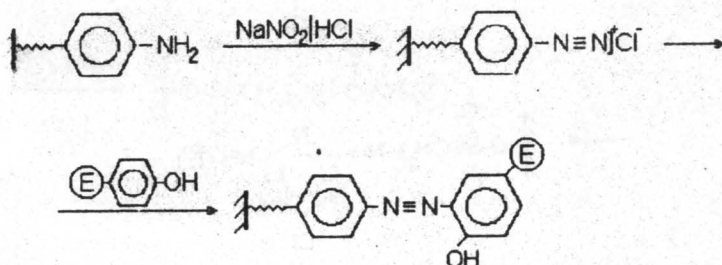
Arilaminoderivații suportului se prepară prin reacția p-nitrobenzoilclorurii cu suportul alchilaminosilanizat. Aril-amina poate fi activată prin aceleași metode folosite la imobilizarea pe suporturi organice, cea mai utilizată metodă fiind prin intermediul diazoderivaților (săruri de diazoniu):



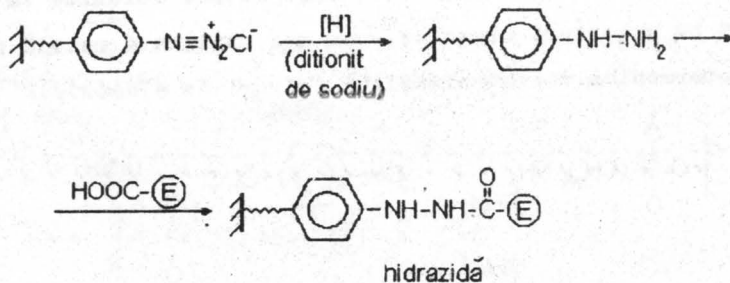


arilaminoderivat

Etapa următoare este cuplarea cu enzima, prin intermediul sărurilor de diazoniu:

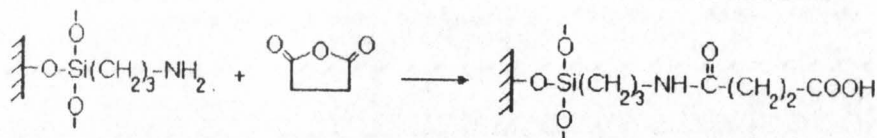


sau prin intermediul hidrazinelor, metodă mai puțin folosită, dar care servește la legarea enzimelor prin grupele COOH libere:



- Cuplarea enzimelor cu derivații carboxilici ai suportului

Făcând să reacționeze alchilaminoderivații suportului cu anhidrida succinică se obține un derivat cu grupă COOH terminală;

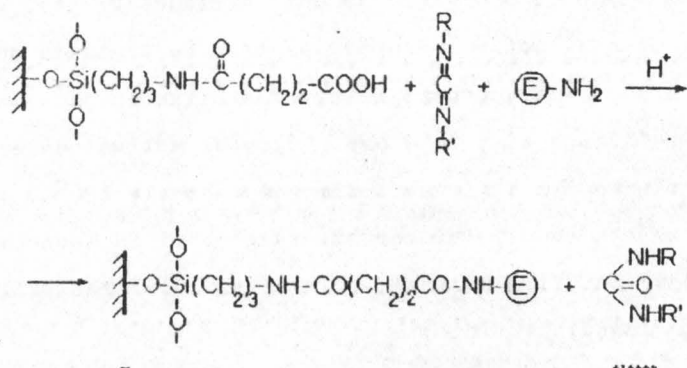


Reacția durează 15 ore la temperatura camerei, la pH = 6.

Produsul se spală și se usucă.

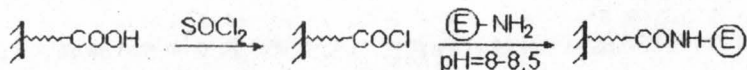
Enzimele se fixează prin metodele cunoscute, care implică participarea grupărilor COOH ale suportului activat, ca:

- Reacții în prezența carbodiimidelor:



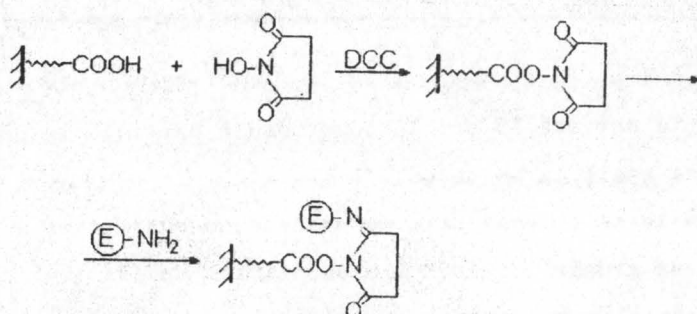
- Reacții cu enzima prin intermediul clorurii acide

Clorura acidă preparată din derivatul carboxilic al suportului este foarte instabilă și trebuie utilizată imediat după obținere.



- Reacția cu enzima prin intermediul gruprii esterice

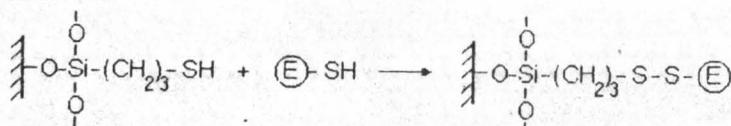
De la derivatul carboxilat al suportului se pot obține cu ușurință esteri activi, rezistenți la stocare și care se cuplează cu enzimele în condiții blânde și cu viteze mari:



3°. Cuplarea enzimelor cu derivați alchiltiosilanici

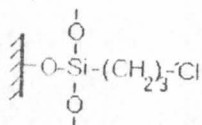
După cum reiese din fig. nr.15 (pag. 192.) dacă $X = -SH$, pe suprafața unui suport anorganic se pot introduce grupări alchiltiosilanice. Pentru activare suportul poros se tratează cu o soluție apoasă de γ -mercaptopropiltrimetoxisilan la $pH = 5$ ($X = -SH$; $n=3$), prin refluxare timp de 4 ore. Suportul activat este apoi spălat cu apă distilată și uscat timp de 4 ore la $120^\circ C$.

Pe suprafața suportului vor exista grupări SH deosebit de reactive, care pot fixa enzimele prin intermediul resurselor de cisteină din lanțul peptidic:



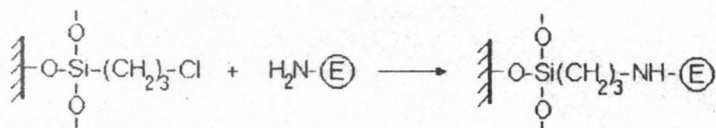
4°. Cuplarea enzimelor cu derivații alchil-halosilanici ai suportului

Dacă în schema din fig.nr.15 (pag. 192) $X = \text{halogen}$, atunci se fixează pe suport grupări cu halogen reactiv. Astfel, pentru $X = Cl$ și $n=3$ se va forma un γ -cloropropilderivat:



reacția suportului cu γ -cloropropiltriethoxisilanul are loc în toluen.

urmează cuplarea cu enzima, care are loc de obicei la pH = 8-9, la 0°C:



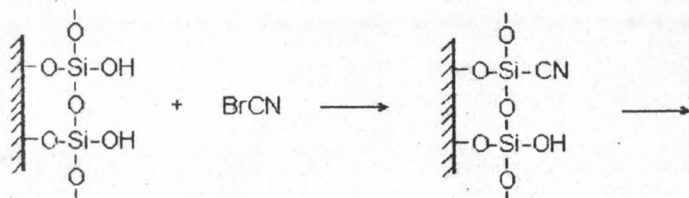
I.2.4.2. Tehnica fixării enzimelor pe suporturi anorganice în absența agenților silanici de cuplare

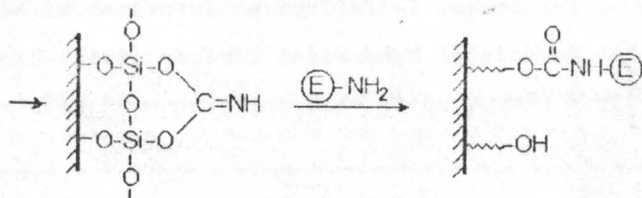
Resturile silanol de pe suprafața sticlei și grupările oxizilor metalici hidratați de pe suprafețele ceramice pot reacționa cu unele grupări activatoare.

Suporturile astfel activate pot lega covalent enzimele, formând legături permanente.

a) Cuplarea cu BrCN pe sticlă poroasă

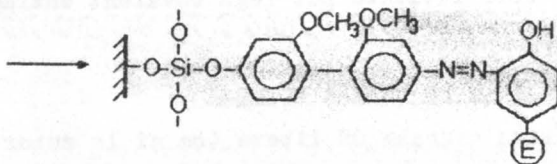
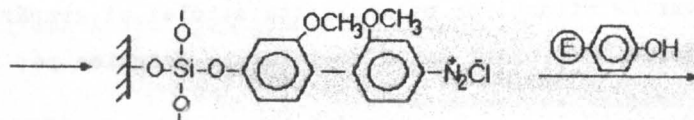
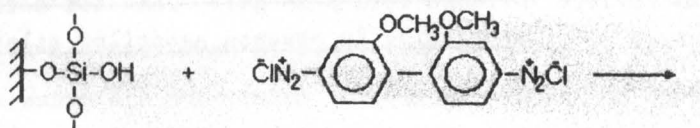
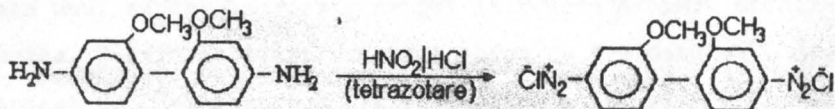
BrCN poate activa grupele OH libere (ca și la suporturile organice):





imidocarbonat

b) Cuplarea prin intermediul unui derivat bis-diazoic se face cu dianizidină:



Alegerea uneia dintre aceste tehnici de imobilizare depinde de proprietățile enzimei care se fixează pe suport.

Astfel, enzimele care se dezactivează la $\text{pH} > 8$ pot fi imobilizate prin tehnici care necesită valori mai joase ale pH -ului (cu glutaraldehidă) sau în cazul pepsinei, cu carbodiimidă.

La fel, enzimele care se denaturează ușor la valori de pH mici pot fi imobilizate în condiții de pH alcalin.

Alți factori care se iau în considerare: grupele aflate la situsul activ și care ar putea să se lege de suportul activat, temperatura de cuplare, tăria ionică și alți factori care pot denatura enzima sau pot interfera cu reacțiile de cuplare.

În cazul proteazelor se recomandă o cuplare la temperaturi joase ($0-4^{\circ}\text{C}$) o scurtă perioadă de timp, pentru a evita autoliza.

2.2. Comparații între tehnicile de imobilizare a enzimelor pe suporturi

Un procedeu universal de imobilizare ar constitui idealul pentru obținerea unor preparate operaționale de suport - enzimă, obiectiv ce nu poate fi atins datorită mării diversități a structurii biocatalizatorilor, suporturilor și substratelor, ca și a condițiilor de reacție în care sunt folosiți aducții. Fiecare metodă de imobilizare prezintă limite de aplicare. Uneori, pentru a crește eficacitatea biocatalitică a aducțiilor se folosesc tehnici combinate de imobilizare (adsorbție și reticulare, encapsulare și reticulare etc.). În tabelul nr. 23 sunt indicate principalele avantaje și dezavantaje ale unor tehnici de imobilizare.

Tabelul Nr. 23

Date comparative privind diferite tehnici de imobilizare
a enzimelor

Caracteristici ale procedeului	Reticu- lare	Adsorb- ție	Legare ionică	Legături metalice	Legături covalen- te	Inclu- dere
1	2	3	4	5	6	7
Ușurința preparării aductului enzimă-suport	Iner- mediară	Simplă	Simplă	Simplă	Dificilă	Difi- cilă
Forțe de legătură	Puter- nice	Slabe	Inter- mediare	Inter- mediare	Puterni- ce	Inter- mediare
Activitatea enzimatică a aductului	Slabă	Inter- mediară	Înaltă	Înaltă	Înaltă	Slabă
Regenerarea suportului	Imposi- bilă	Posibi- lă	Posibi- lă	Posibi- lă	Rară	Imposi- bilă
Costul imo- bilizării	Inter- mediar	Mic	Mic	Inter- mediar	Mare	Inter- mediar
Stabilitatea preparatului	Înaltă	Mică	Inter- mediară	Inter- mediară	Înaltă	Înaltă
Aplicabilitate generală	Nu	Da	Da	Da	Nu	Da
Protecția enzimei față de atacuri microbiene	Ocazi- onală	Nu	Nu	Nu	Nu	Da

Imobilizarea chimică (reticulare intermoleculară, legare covalentă de suport) produce modificări mai mari sau mai mici ale structurii chimice a enzimei, ceea ce poate duce la modificări conformaționale și la inactivarea sa parțială. Pentru a evita acest lucru, imobilizarea covalentă trebuie condusă în condiții cât mai blânde. Stabilitatea operațională a acestor aducți este înaltă, datorită tăriei legăturii dintre suport și enzimă sau dintre molecule diferite de enzimă.

Cea mai răspândită metodă de imobilizare chimică pentru enzimele pure rămâne reticularea. Regenerarea este posibilă numai dacă enzima este legată covalent de un suport anorganic.

Pe de altă parte, imobilizarea fizică prin formare de legături van der Waals, metalice, de hidrogen, saline etc., decurge ușor și în condiții foarte blânde. Totuși forțele de legare sunt foarte slabe, enzima putându-se desprinde de pe suport chiar la variații de pH. Preparatele obținute au o activitate inițială ridicată, dar o stabilitate operațională mică în timp.

Regenerarea se poate face foarte ușor, indiferent de natura suportului (organică sau anorganică).

Includerea fizică a enzimelor în geluri se caracterizează printr-o bună conservare a activității biocatalizatorului, dar utilizarea sa se limitează doar la substraturi și produse cu masă moleculară mică, datorită puternicei împiedicări a transferului de masă prin membranele microcapsulelor și prin particulele de gel ale suportului.

I.3. Investigarea proprietăților fizice ale enzimelor imobilizate

Proprietățile fizice ale aducților suport-enzimă diferă de cele ale enzimei libere (native), fiind influențate de :

- efectele de microvecinătate ale suportului;
- condițiile de restricție impuse de legături mai puternice (ionice, covalente) dintre enzimă și suport;
- constrângeri sterice, datorate apropierii dintre suport și proteinele legate de el.

Gradul în care fiecare din acești factori poate influența enzima depinde de metoda de imobilizare.

În mod simplificat, se poate considera că o enzimă imobilizată este o enzimă a cărei mobilitate difuzională este restrânsă, fie că este vorba de metodele fizice sau chimice de imobilizare.

Este de așteptat ca microencapsularea să aibă un efect minim asupra proprietăților fizice ale enzimei, pe când imobilizarea covalentă le poate altera serios. Alte metode, ca includerea în geluri sau adsorbția vor avea efecte intermediare față de aceste extreme. Două dintre proprietățile fizice influențează cel mai mult enzimele imobilizate:

- a) Modificările conformaționale și
- b) restricțiile impuse de imobilizare asupra modificărilor conformaționale.

Restricții ale flexibilității conformaționale determinate de reticularea multiplă a unei enzime pe un suport stabil și inert pot conduce la o creștere intensă a stabilității termice și a instabilității la acțiunea unor agenți de denaturare (uree).

Alăturarea unor sarcini electrice de pe suport de sarcinile electrice de pe proteine (erect de tip Donnan) poate determina o microvecinătate total diferită de restul mediului. Acest efect, alături de posibilitatea modificării structurii soluțiilor apoase ca rezultat al erectului grupărilor hidrofobe de pe suprafața suportului, poate influența modificarea conformației enzimei imobilizate față de cea a enzimei libere.

Dacă enzima este intracelulară, efectele enumerate pot aduce biocatalizatorul imobilizat în condițiile prezente „in vivo”.

I.3.1. Heterogenitatea preparatelor de enzime imobilizate

Se insistă asupra flexibilității conformaționale a enzimelor imobilizate, deoarece acest factor este hotărâtor pentru cinetica reacțiilor efectuate cu aducții respectivi. Pe lângă aceasta, se mai examinează densitatea și gradul de distribuție ale enzimei pe suprafața suportului. Gradul de heterogenitate este greu de apreciat la majoritatea aducțiilor suporturi - enzime.

Se știe că legarea covalentă a unei enzime omogene pe suport poate conduce la preparate înalt - heterogene, ceea ce îngreunează mult problema investigării proprietăților fizice ale enzimelor imobilizate.

În schimb, procedeele de imobilizare necovalente sunt bazate pe o orientare specifică a moleculelor de enzimă pe suprafața suportului.

În consecință, enzimele pot fi legate cu situsul activ spre mediul înconjurător, total sau parțial (fig. nr.16 cazurile 1 și 2) sau către suport (fig. nr.16 cazul 3).

Aceste moduri de legare pot influența activitatea remanentă a enzimei imobilizate și, în consecință, cinetica reacțiilor biocatalizate de preparatele respective.

În cazul reticulării enzime - suport, apare un factor de heterogenitate datorat numărului variabil de legături dintre acestea.

Moleculele enzimei vor fi orientate diferit față de suprafața suportului, în funcție de numărul grupărilor reactive ale

enzimei capabile de a forma asemenea legături (Fig. nr.17), unele molecule de enzimă având doar o legătură cu suportul, iar altele două sau mai multe.

Fig. nr. 16

Posibilitățile de orientare ale situsurilor active ale unor enzime imobilizate covalent pe suport

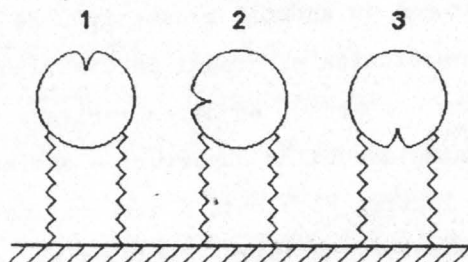
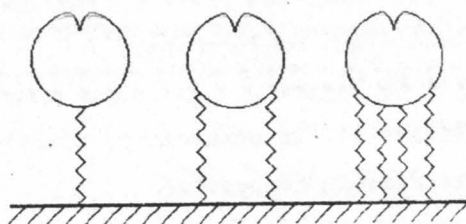


Fig. nr. 17

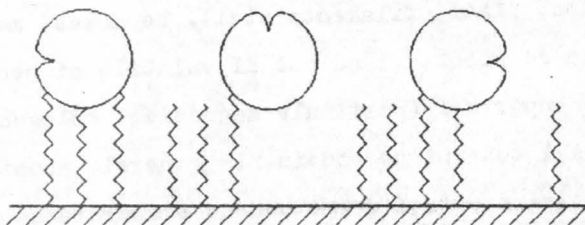
Distribuția neomogenă a numărului legăturilor reticulate dintre suprafața suportului și moleculele de enzimă



Dar enzima poate fi orientată diferit față de suprafața suportului, în funcție de grupările din molecula sa care au participat la reticulare (fig. nr. 18).

Fig. nr. 18

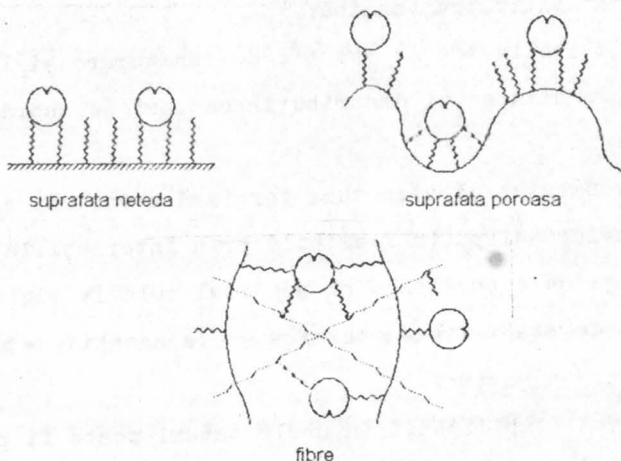
Distribuția neomogenă a enzimelor pe suport, în funcție de poziția grupărilor reactive ale proteinei care au participat la reticulare.



Toți acești factori contribuie la heterogenitatea suprafețelor aducților, alături de forma de prezentare a suportului. Astfel, o suprafață solidă, netedă, poate avea un grad mai mare de uniformitate decât o suprafață solidă neregulată. În special suporturile fibroase și poroase au un potențial mai mare de heterogenitate (Fig. nr. 19).

Fig. nr. 19

Gradul de heterogenitate în preparatele de enzime imobilizate depinzând de natura suprafeței suportului



Problema varietății suporturilor

Metodele de caracterizare fizică sunt legate de natura și forma preparatelor de enzime imobilizate (pe polimeri naturali sau sintetici, anorganici sau organici, tuburi, folii, particule sferice, plăci, filamente etc.). De aceea, metodele aplicate la un tip de suporturi nu pot fi valabile și pentru altele. Pentru unele suporturi (particule magnetice, collagen) se pot însă folosi aceleași tehnici de studiu. În general, aceste studii au o mare selectivitate față de metoda de preparare a enzimelor imobilizate.

I.3.2. Proprietăți fizice investigate

În cele ce urmează se vor aminti câteva proprietăți mai importante investigate în literatură; este vorba de proprietățile fizice ale preparatelor de enzime imobilizate și nu ale enzimelor în sine. În consecință studiile făcute s-au referit la:

- a) - modificările conformaționale;
- b) - flexibilitatea conformațională;
- c) - stabilitatea termică;
- d) - stabilitatea la agenții de denaturare și la proteoliză
- e) - densitatea și distribuția enzimei pe suprafața suportului.

S-a constatat că structura terțiară a enzimei este stabilizată și devine mai puțin flexibilă prin interacțiile ionice puternice și cele covalente cu suportul relativ rigid. În consecință, crește stabilitatea termică și la agenții de proteoliză și de denaturare a enzimei.

Scăderea stabilității în unele cazuri poate fi pusă pe seama efectului stresant al interacțiilor proteină -suport asupra structurii terțiare a proteinei, formându-se conformații mai puțin

stabile. Legăturile multiple și efectul lor stresant pot influența serios conformația din interiorul proteinei, ceea ce poate influența sau nu stabilitatea și proprietățile sale biocatalitice.

În majoritatea cazurilor, creșterea stabilității termice se explică prin prevenirea autodigestiei în cazul proteazelor imobilizate sau prin prevenirea contaminării cu proteaze în cazul altor enzime.

Pentru o bună perioadă de timp, s-a considerat că diferențele dintre proprietățile cinetice ale enzimelor native și imobilizate s-ar datora modificărilor produse pe suport de microvecinătatea enzimei; ulterior s-a constatat că efectul este produs în principal de modificările conformaționale ale enzimei imobilizate. Pentru investigații s-au folosit metode fizice: fluorimetrice, spectrofotometrice, dicroism circular, RES, ca și tehnici nespectrofotometrice: reacții de schimb izotopic, tehnici distructive (susceptibilitatea la atacul cu enzime proteolitice) etc.

Astfel, metoda schimbului izotopic constă în dizolvarea proteinei denaturate în D_2O ; are loc un schimb rapid H-D la grupurile cu: N, O și S. În proteinele native factorii structurali sunt cei care pot influența viteza acestei reacții de schimb, unii atomi de H din proteină neparticipând la reacție chiar timp de câteva zile, la temperatura camerei. Astfel, atomii de H de la grupele $-NH_2$ vor reacționa mult mai repede decât cei de la grupările amidice din lanțul peptidic. Vitezele reacțiilor de schimb pot fi corelate deci cu conformația proteinei și cu proximitatea grupărilor ce au H reacționabil, față de moleculele de D_2O .

Se înregistrează curbele schimbului H-D la diferite pH-uri, ceea ce dă indicații asupra capacității proteinei de a-și expune sau nu legăturile peptidice la schimbul cu solventul. Tehnica se aplică la multe enzime imobilizate, mai ales dacă se folosește

apă tritilată.

Unele tehnici distructive au aplicabilitate mai mare în recunoaşterea modificărilor conformaţionale survenite în moleculele enzimelor imobilizate. Una dintre acestea este susceptibilitatea la atacul enzimelor proteolitice, ceea ce face să descrească în mod dramatic acţiunea proteolitică asupra enzimelor imobilizate, faţă de cele native.

Metoda se foloseşte şi pentru enzimele imobilizate care au o structură cuaternară.

Metode fizice de estimare a densităţii enzimelor pe suport

Prin elipsometrie şi microscopie electronică se poate evalua cantitatea, concentraţia şi distribuţia proteinei imobilizate pe suprafaţa suportului. Graves (1976) a folosit o metodă de microspectrofotometrie - laser pentru a determina vitezele de reacţie la suprafaţa sau sub suprafaţa unui gel ce conţine o enzimă imobilizată.

I.4. Metode chimice de caracterizare a enzimelor imobilizate

Aceste metode se referă atât la suporturi ca reactivi chimici cât şi la enzimele imobilizate.

I.4.1. Suportul ca reactiv chimic

În mare parte proprietăţile conjugatului enzimă - suport depind de structurile reactive ale suportului. Deoarece cantitatea totală de enzimă legată creşte cu creşterea concentraţiei grupărilor reactive, activitatea specifică a enzimei după imobilizare tinde să scadă cu creşterea conţinutului în proteină al conjugatului. După cum am mai arătat, numărul de legături prin

care este fixată enzima de suport poate influența proprietățile fizico-chimice sau enzimatice ale proteinei (de exemplu, rezistența la denaturare).

Metodele de caracterizare chimică a suportului constau în dozarea grupărilor reactive ale acestuia.

I.4.1.1. Dozarea grupării carboxil (COOH)

Grupele COOH se pot doza prin titrarea directă a polimerului în NaCl 0,5 M, cu NaOH , ori în dimetilformamidă, cu soluție de metoxid de sodiu în amestec de metanol-benzen.

Se mai poate folosi metoda cuplării grupelor COOH din polimerul-suport cu grupele -NH_2 din esterul etilic al glicinei, prin care se determină cantitatea de glicină incorporată în polimer.

I.4.1.2. Determinarea grupelor amino (-NH_2)

Grupele -NH_2 se determină utilizând anioni radioactivi (cu H^{36}Cl 0,1 M); se poate folosi și reacția cu acid carboxilic, identică cu cea de determinare a grupei -COOH .

I.4.1.3. Determinarea grupelor sulfhidril (-SH)

O cantitate din gelul de determinat, conținând 0,015-0,5 moli de grupe -SH este suspendată într-o soluție tampon 0,1 M Tris-HCl ($\text{pH} = 7,6$); suspensia este apoi amestecată cu 2,2'-ditiodipiridină. După o ședere de 30 minute la temperatura camerei, soluția se filtrează și i se determină absorbanta la 343 nm.

I.4.1.4. Determinarea grupelor carbonil (>C=O)

Dozarea grupelor >C=O se face sub formă de oximă, făcând să reacționeze 1 g de suport cu clorhidrat de hidroxilamină (soluție în apă + alcool).

I.4.1.5. Determinarea grupelor diazo ($-N \equiv N^+$)

Determinarea grupelor $-N \equiv N^+$ se face prin tratarea suportului cu p-bromfenol, urmată de dozarea bromului legat.

Se observă că în general concentrația grupărilor reactive de pe suprafața suportului depășește capacitatea lor de cuplare cu proteinele.

O contribuție o are factorul steric, distanța dintre grupările reactive fiind mai mică decât dimensiunile moleculelor proteinelor. În al doilea rând pot apare împiedicări sterice datorită suportului și în al treilea rând, reactivitatea proteinei poate fi mai mică, apărând reacții secundare, ca hidroliza.

I.4.2. Determinarea randamentului de cuplare și a proteinei legate

În general, cantitatea de proteină legată de suport poate fi corelată cu proprietățile enzimatice ale conjugatului. Cantitatea de enzimă cuplată se apreciază prin investigarea proprietăților cinetice ale aductului suport-enzimă.

I.4.2.1. Diferența între proteina introdusă în reacția cu suportul și proteina recuperată

Metoda cea mai simplă de determinare cantitativă a proteinei cuplate cu suportul este măsurarea dispariției materialului proteinic din amestecul de reacție, prin metode spectrofotometrice (măsurarea absorbției în UV la lungimea de undă caracteristică proteinei respective).

Pentru aceasta, conjugatul suport-proteină se filtrează și se spală cu o soluție tampon, până la îndepărtarea totală a enzimei neimobilizate. Metoda este rapidă și ușor accesibilă.

I.4.2.2. Analiza elementară

Pentru determinarea randamentului imobilizării, se poate doza azotul din aductul suport-enzimă, prin metodele cunoscute. Metoda nu se poate adapta la geluri ca : poliacrilamidă, polizaharide activate cu BrCN, polimeri diazotați sau schimbători de ioni ce conțin azot în moleculă.

Sulfurul nu se dozează în conjugatele de suport-proteină, ci numai pentru determinarea conținutului în sulfură al unor substanțe cu masă moleculară mică fixate pe suport.

Conținutul în nucleotide din conjugate se determină prin dozarea ionilor fosfat.

I.4.2.3. Analiza aminoacizilor

Se aplică metoda binecunoscută a hidrolizei acide a conjugatului proteină-suport, urmată de dozarea aminoacizilor rezultați.

Pentru aceasta, o cantitate mică de conjugat (0,1-10 mg) se hidrolizează cu HCl 6 M, 24 ore la 110°C. În aceste condiții are loc solubilizarea majorității suporturilor organice.

Hidrolizatul este apoi evaporat la sec, dizolvat în soluție tampon, centrifugat și introdus în analizorul de aminoacizi. Se recuperează toți aminoacizii din lanțul proteinei, cu excepția celor legați inițial de suport. Metoda are unele limite determinate de posibilitatea reacțiilor secundare ce pot avea loc între suportul-polymer și aminoacizii formați. Acest procedeu rămâne totuși cel mai răspândit.

I.4.2.4. Alte metode

Dacă proteinele sunt legate reversibil de suport (în afară de cazurile legăturilor ionice), cantitatea de proteină imobilizată pe gel poate fi determinată prin desprinderea proteinei din

aduct. Metoda este folosită la imobilizarea și purificarea ureazei.

Proteinele conținând grupări prostetice labile trebuie transferate în soluție în așa fel încât aceste grupări să nu fie îndepărtate.

Se pot folosi și metode spectrofotometrice pentru determinarea conținutului în nucleotide al aductului suport-proteină.

Determinarea cantitativă a cromoforilor imobilizați se poate face prin măsurarea directă a absorbției suspensiei de aduct într-un solvent vâscos (polietilenglicol 1%), folosind ca martori suporturile ca atare.

Se pot utiliza și unele reacții de culoare specifice pentru aminoacizii din proteina imobilizată (pentru arginină, triptofan etc.). Metoda nu are aplicabilitate universală.

Se mai poate folosi metoda desprinderii de pe suport a proteinei prin tratare cu pronază, urmată de dozarea colorimetrică a materialului solubilizat, cu o soluție de ninhidrină.

Dintre toate metodele descrise pentru dozarea cantității de proteină din aductul suport-enzimă, două sunt cele mai utilizate, datorită simplității, acurateții și caracterului lor aproape general:

- determinarea diferenței dintre cantitatea de proteină adăugată inițial la suport și cea rezultată la spălarea avansată a aductului și

- analiza aminoacizilor rezultați prin hidroliza totală a aductului suport-enzimă.

I.4.3. Determinarea centrilor activi ai enzimelor imobilizate

Pentru determinarea situsului reactiv al enzimei imobilizate se folosesc în general aceleași procedee ca și pentru enzima liberă.

I.4.3.1. Determinarea fotometrică

Pentru că se pot produce interferențe ale semnalelor între conjugat și enzimă, se iau precauții speciale, pentru a preveni intervenția în sistem a particulelor de enzimă. Ford și colaboratorii (1973) au utilizat un reactor-coloană cu pat compact cu tripsină imobilizată, prin care s-a pompat o soluție de p-nitro-fenil-p'-guanidin-benzoat, reactiv pentru situsul activ al tripsinei. Eluentul este apoi trecut într-un spectrofotometru, determinându-se p-nitrofenolul rezultat prin extrapolare față de curba etalon trasată la timpul zero, la 410 nm.

I.4.3.2. Determinarea fluorometrică

Metoda este mai ușor de aplicat la enzimele imobilizate.

Astfel, chimotripsina imobilizată se determină cu cinamat de 4-metilumbeliferil-p(N,N,N-trimetilamoniu) care nu este fluorescent, dar care eliberează 4-metilumbeliferona fluorescentă.

Concentrația de 4-metilumbeliferonă formată este calculată prin extrapolare față de o curbă etalon construită cu 4-metilumbeliferonă, la 450 nm și la timpul zero.

Metoda este mai sensibilă decât titrarea fotometrică, deoarece se pot determina ușor cantități mai mici de 0,1 mmoli enzimă.

I.4.3.3. Metoda RES (Rezonanță electronică de spin)

Concentrația centrilor activi din tripsina imobilizată se

poate determina prin hidroliza cu NaOH 0,5 M a unui radical liber atașat de enzimă.

Radicalul $\text{NO}_2^{\bullet}$ se determină cantitativ prin spectroscopie RES.

2.4.3.4. Alte metode

Determinarea grupărilor SH din proteinele imobilizate s-a folosit în cazul papăinei după reacția aductului cu acid iodacetic și determinarea carboximetilcisteinei rezultată după hidroliză.

Reacția cu inhibitori cu masă moleculară înaltă se aplică la preparatele enzimatice accesibile unor substraturi mari, deoarece în cazul substraturilor mici, numai o parte din centrul activ al enzimei își pot păstra activitatea față de acestea.

Reacția de schimb izotopic, amintită mai înainte (pag. 209.) poate fi folosită atât pentru enzime imobilizate covalent, cât și necovalent pe suporturi.

Legarea unor compuși radioactivi pe enzimele imobilizate a fost elaborată pentru NAD, care a fost atașat pe lactatdehidrogenază imobilizată. O cantitate cunoscută de enzimă imobilizată este suspendată într-o soluție de NAD în tampon-fosfat 0,1 M (pH = 8), conținând o cantitate cunoscută de NAD marcată cu ^{13}C . După o ședere de 1 h, o probă de supernatant este introdusă într-un scintilator de lichide computerizat. Se determină proporția de NAD legat.

Conținutul în proteină al conjugatelor de enzime imobilizate se poate determina prin metode descrise pentru majoritatea enzimelor active din aducți.

Inactivarea proteinei se poate produce din mai multe cauze: în timpul imobilizării (datorită autolizei în cazul proteazelor), dacă reacțiile de cuplare cu suportul blochează situsul reactiv al enzimei etc.

Eficacitatea preparatelor de enzimă imobilizată se apreciază prin determinări cinetice.

I.5. Aspecte ale cineticii enzimelor imobilizate

Prin imobilizarea unei enzime pe un suport solid, biocatalizatorul este extras din mediul său nativ, fiind expus unor efecte locale care depind de proprietățile chimice și de natura suportului.

Termenul de „efecte de microvecinătate”, introdus de Katchalski, se referă la faptul că principala deosebire dintre o enzimă liberă și una imobilizată este aceea că prin imobilizare biocatalizatorul nu mai este complet înconjurat de mediul de reacție. Nu există deci siguranța că în mediul imediat apropiat de enzimă (în „microvecinătate”) condițiile sunt identice cu cele din restul mediului de reacție.

Efectele imobilizării asupra comportării cinetice a unei enzime, pot fi clasificate după cum urmează:

1) Efecte sterice și conformaționale

Conformația enzimei se poate modifica prin imobilizarea sa pe suport, astfel încât unele părți ale moleculei sale să fie mai puțin accesibile pentru substrat.

2) Efecte de partiție

Cinetica observată a unei enzime plasată pe un suport poate diferi de cea a aceleiași enzime în soluție, chiar în absența efectelor difuzionale. Această modificare se poate atribui faptului că concentrația speciilor încărcate electric, ^a substratelor, produșilor și reactanților, a ionilor de H^+ sau OH^- etc., în apropierea enzimei imobilizate pot diferi de acelea din restul soluției, datorită interacțiilor electrostatice cu sarcinile existente

pe suport. Astfel, diferențele dintre concentrațiile la echilibru observate la solutele încărcate electric se pot defini cu ajutorul coeficientului de partiție $\mathcal{P}$:

$$\mathcal{P} = C_1/C_0$$

în care C_1 reprezintă concentrația locală, iar C_0 concentrația din restul soluției.

2) Efectele de microvecinătate asupra parametrilor catalitici intrinseci ai enzimei pot reflecta faptul că interacțiile enzimă - substrat decurg în microvecinătăți diferite atunci când enzima este imobilizată pe un suport.

3) Efectele de difuzie și de transfer de masă

Acestea se datoresc rezistenței difuzionale opuse translocării substratului, produsului de reacție, reactantului etc. la și de la centrul activi ai enzimei și se pot întâlni în particular în cazul unor reacții enzimatice și al unor conformații în care grosimea particulelor sau a membranelor este relativ mare.

O enzimă imobilizată care acționează în asemenea condiții de restricții difuzionale face ca și concentrațiile locale ale produsilor de reacție sau reactanților să fie diferite de cele din restul soluției.

Efecte difuzionale considerabile pot apărea în cazurile particulare ale închiderii enzimelor în geluri prin copolimerizare, adsorbției sau cuplării covalente cu un suport poros. În timpul reacției, substratul poate difuza în faza externă într-un strat lichid mai static decât restul soluției care înconjoară particula. Soluția stagnează în pori, localizând enzima. Produsul de reacție poate difuza în sens invers, spre faza exterioară a soluției. Asemenea transferuri de masă crează probleme în utilizarea preparatelor de enzime imobilizate, alterând apreciabil cinetica reacțiilor respective.

Efectul difuzional poate fi și o consecință a modificărilor aparente ale proprietăților enzimei, ce pot fi provocate de tehnica de imobilizare folosită.

În cazul enzimelor imobilizate în care cinetica aparentă poate fi controlată atât de efectele de microvecinătate cât și de cele de transfer de masă, se pot distinge:

- parametrii intrinseci ai vitezei de reacție, adică parametrii cinetici caracteristici enzimei în stare nativă (solubilă);
- parametri de viteză inerenți caracteristici enzimei imobilizate în absența restricțiilor difuzionale și
- viteza și cinetica efective, observate la o enzimă imobilizată, în prezența unor efecte difuzionale apreciabile.

Tratatele care se ocupă pe larg de cinetica enzimelor imobilizate sumarizează diverși parametri care o influențează.

În general, viteza unei reacții enzimatice catalizată de biocatalizatori imobilizați poate fi descrisă prin relațiile (1) și (2):

$$v = f(T, [E], pH, \mu, [P], I, [J], [S]) \quad (1)$$

$$v = \frac{V_{\max} [S]}{K_M + [S]} \quad (2)$$

în care: T = temperatura ($^{\circ}K$)

$[E]$ = concentrația enzimei;

μ = modulul substratului pentru difuzia externă

($V_{\max}/h_s K_m$; h_s = coeficientul de transport al substratului);

$[P]$ = concentrația produsului;

I = tăria ionică;

$[J]$ = concentrația inhibitorului;

$[S]$ = concentrația locală a substratului;

v = viteza efectivă a reacției;

$V_{\max}$ = viteza maximă a reacției enzimaticice;

k_M = constanta Michaelis

Majoritatea observațiilor arată modificări ale constantei Michaelis (K_M) a unei enzime după imobilizare, dar nu se poate determina cu precizie mărimea aportului influențelor de vecinătate și al modificărilor constantei aparente K'_M ($K'_M = [S_0]$; $[S_0]$ = concentrația substratului în soluție, când $v = V_{\max}/2$).

I.5.1. Parametrii care influențează cinetica reacțiilor cu enzime imobilizate

Vor fi examinați în conzinuare principalii parametrii care influențează în ultimă instanță activitatea biocatalitică a enzimei imobilizate.

I.5.1.1. Concentrația enzimei ($[E]$)

În urma imobilizării enzima se poate dezactiva mai mult sau mai puțin, în funcție de natura suportului și de metoda de imobilizare folosită.

Cel mai frecvent efect al imobilizării este dezactivarea enzimei. Inactivarea totală a enzimei apare în cazul în care imobilizarea afectează centrul activ al biocatalizatorului. Chiar în condiții optime de imobilizare, nu se poate păstra mai mult de 80% din forma activă a enzimei. De exemplu, datele din tabelul nr.24 arată că numai 55% din radioactivitate și numai 10% din activitatea enzimatică a aldolazei se păstrează după imobilizare.

Tabelul nr. 24

Imobilizarea aldolazei marcată cu ^{14}C pe poliacrilamidă

Sursa	% recuperare a:	
	activității	radioactivității
Enzimă imobilizată pe poliacrilamidă	10,4	55,0
Faza apoasă după imobilizare	33,1	44,2
Faza apoasă după:- prima spălare	1,0	0,7
- a 2-a spălare	0	0,3
- a 3-a spălare	0	0
Recuperare totală	44,5	100,2

Este deci riscant să se afirme că toată enzima recuperată a fost imobilizată, regăsindu-se sub formă activă. Din acest motiv, majoritatea efectelor observate după imobilizare asupra vitezei de reacție și a valorii constantei catalitice sunt infirmate, deoarece orice modificare a concentrației efective a enzimei le poate afecta.

Viteza de reacție scade și dacă imobilizarea are ca efect blocarea sterică a centrilor activi ai enzimei.

În ceea ce privește concentrația efectivă a enzimei disponibile pentru reacție după imobilizare, se observă că această concentrație poate varia cu dimensiunea moleculelor substratului, dacă enzima a fost imobilizată în pori.

De exemplu proteaza imobilizată astfel prezintă o activitate catalitică mai mare față de esterul etilic al N-benzoil-L-argininei, decât față de caseină.

Sarcinile electrice de pe suprafața suportului pot respinge

la rândul lor un substrat cu sarcini similare, ceea ce reduce concentrația efectivă a enzimei. Activitatea aparentă a enzimei imobilizate poate fi și o consecință a efectului hidrofob. Brockman și colaboratorii au adsorbit lipaza pancreatică pe perle de sticlă (cu caracter hidrofob) și au observat că eficiența catalitică a enzimei imobilizate asupra substratului de tripropionin este de aproximativ 3 ori mai mare decât cea a enzimei solubile. Deoarece nu se observă nici o modificare în activitatea intrinsecă a enzimei imobilizate, s-a tras concluzia că activitatea aparentă se datorează ușurinței cu care suprafața hidrofobă a suportului duce la creșterea concentrației locale de substrat.

I.5.1.2. Temperatura (T)

Adeseori imobilizarea poate determina creșterea termostabilității enzimei. Un studiu efectuat de Melrose asupra a 50 de enzime imobilizate a arătat că 30 dintre ele nu au o stabilitate termică și în timp mai mare sau mai mică, pe când restul de 20 prezintă aceeași stabilitate în comparație cu enzimele native (libere).

Dacă materialul din care este confecționat suportul este termosensibil, aceasta limitează domeniul de temperatură în care poate fi utilizat aductul suport-enzimă. Acest lucru se observă în special la sisteme imobilizate pe „Hollow-fiber”, encapsulate sau incluse în gel.

Cele mai mari modificări ale temperaturii optime de reacție în comparație cu enzimele libere, se observă la enzimele incluse în gel și într-o oarecare măsură la cele legate ionic și covalent de suporturi. Acest fenomen se poate atribui efectelor difuzionale deosebite la biocatalizatorii incluși sau legați de suporturi poroase și protejați astfel de denaturarea termică. Temperatura din microvecinătatea enzimei este mai mică decât în restul soluției

în cazul enzimelor incluse în gel. În cazul special al imobilizării prin legături ionice sau covalente, modificările conformaționale și factorii de împiedicare sterică pot juca un rol important în creșterea toleranței la denaturarea termică a enzimei.

Energia de activare

Studiind dependența activității de temperatură, se pot calcula energiile de activare și de dezactivare a enzimelor libere și imobilizate.

Efectele difuzionale (care protejează enzima de denaturare) duc la scăderea ambelor tipuri de energie. Efectele de transfer de masă crescând cu temperatura, rezultă că, teoretic, enzimele incluse în gel sau fibre, ca și cele legate de suporturi poroase vor avea energiile de activare cele mai mici (tabelul nr.25)

Tabelul Nr. 25

Energii de activare pentru enzime imobilizate

Enzima	Metoda de imobilizare	Substrat	Energie de activare (KJ/mol)	
			Enzima liberă	Enzima imobilizată
Aminoacilaza	Includere (în gel de poli-acrilamidă)	Acetil-DL-metionină	28,140	23,940
Glucamilaza	Formare de bază Schiff -cu silice poroasă activată cu Ti	Malto-dextrină	57,120	47,460
	- celit activat cu Ti	Amidon solubil	44,520	37,800
	- sticlă cu pori control., activ cu Ti	Amidon solubil	44,520	35,280

În majoritatea cazurilor energiile de activare ale enzimelor imobilizate sunt identice cu ale enzimelor native, ca în cazul β -D-fructofuranozidazei imobilizată prin adsorbție și prin legături ionice sau covalente (Usami și colaboratorii, 1975).

S-au observat și creșteri ale energiei de activare pentru enzime imobilizate, ca de exemplu, pentru lizozim imobilizat prin adsorbție pe collagen (Venkatusubramanian și colaboratorii, 1972) în comparație cu enzima liberă.

I.5.1.3. Influența pH-ului

În cursul imobilizării, același tip de suport se încarcă electric aproape în același mod, indiferent de tehnica de imobilizare folosită.

Existența oricărei sarcini electrice reziduale în aductul suport-enzimă poate determina modificarea pH-ului din microvecinătate. De aceea nu se poate ști cu certitudine dacă pH-ul din microvecinătatea enzimei și cel din restul soluției sunt identice.

Considerând cazul simplu al unei proteine adsorbite pe sticlă (cu sarcini superficiale negative), sistemul format poate necesita un pH aparent optim mai mare decât cel caracteristic enzimei native. Pe de altă parte, sarcinile negative din microvecinătatea moleculei de enzimă pot neutraliza pH-ul soluției din imediata apropiere, în acest domeniu valoarea pH-ului fiind mai scăzută decât în restul soluției. Orice localizare de sarcină va afecta deci pH-ul optim aparent, deplasându-l la valori mai mici sau mai mari decât pH-ul optim al enzimei respective. Goldstein și colaboratorii au demonstrat acest lucru, preparând sisteme enzimatice imobilizate ce conțin un număr mare de grupări încărcate electric. Astfel, ei au copolimerizat chimotripsina și poliornitina; copolimerul rezultat, conținând între 34 și 820 grupări electropozitive

per moleculă deplasează pH-ul optim aparent de la 8,3 la valori mai mici de 7,5.

În mod asemănător, copolimerul anhidridă maleică - etilenă cu chimotripsina, ce conține aproximativ 290 grupări COOH per moleculă, face să crească pH-ul optim aparent la 9,5.

Modificările aduse de pH în activitatea enzimatică pot fi deci uneori dramatice, deplasând considerabil valoarea pH-ului optim al reacțiilor biocatalizate.

Domeniul operațional de pH poate fi limitat și de sensibilitatea suportului însuși față de pH. Aceasta se observă mai ales la enzimele imobilizate prin legături ionice pe sticlă, pH-ul alcalin producând desprinderea enzimei și „solubilizarea” aductului.

I.5.1.4. Tăria ionică (I)

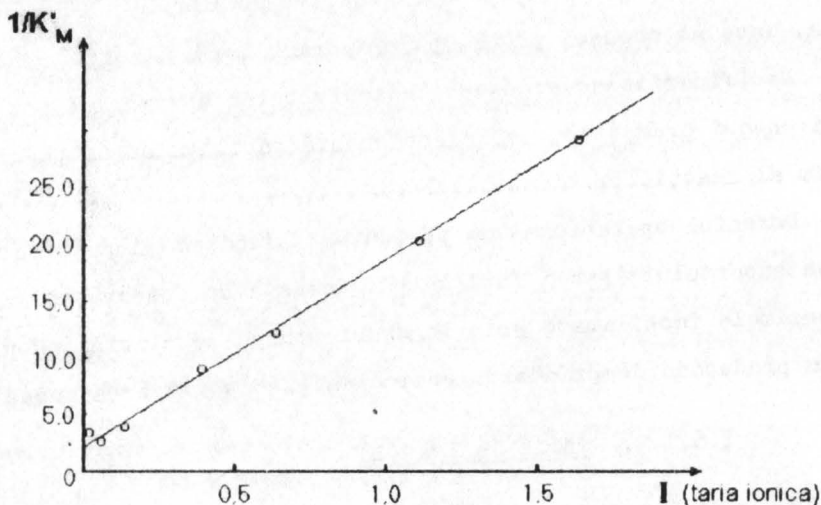
Din motive asemănătoare cu cele de la variația de pH, nu există siguranța că tăria ionică în microvecinătatea enzimei imobilizate este aceeași cu cea din soluția ambiantă. Goldstein a arătat că variația tăriei ionice a soluției poate determina desfacerea legăturilor ionice dintre enzimă și suport.

De exemplu s-a studiat cinetica hidrolizei esterului etilic al N-benzoil-L-argininei cu bromelaină imobilizată pe carboxi-metilceluloză (CMC). Valoarea constantei K_M obținută cu enzima nativă nu depinde de tăria ionică a soluției. În condiții similare, valoarea constantei aparente K'_M la o tărie ionică scăzută s-a găsit a fi mai mică cu aproape un ordin de mărime decât valoarea lui K_M pentru bromelaină nativă, în condiții similare.

K'_M crește odată cu creșterea tăriei ionice, apropiindu-se de o valoare care este ceva mai mică decât cea pentru enzima nativă (fig.nr.20).

Fig. nr. 20

Dependența constantei aparente Michaelis, K'_M , de tăria ionică (I) pentru hidroliza esterului etilic al N-benzoil-L-argininei cu bromelaină imobilizată pe CMC.



Linia plină reprezintă valorile calculate.

1.5.1.5. Concentrația produsului de reacție ([P])

În figura nr. 21 este reprezentată modificarea concentrației produsului de reacție cu timpul pentru o reacție biocatalizată simplă, cu o enzimă nativă.

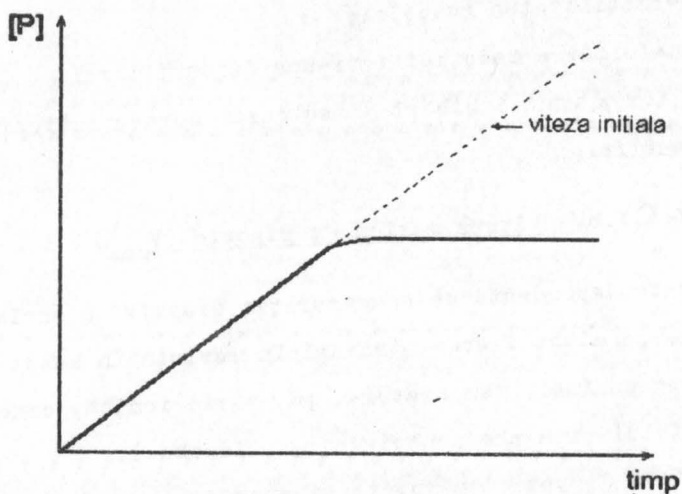
Dacă enzima este imobilizată, această curbă se poate modifica din următoarele motive:

- Uneori, în condiții favorabile de reacție, se observă o perioadă de „întârziere” a reacției.
- Odată reacția inițiată, curba poate fi sau nu paralelă cu cea a enzimei libere.
- Este posibil ca punctul de echilibru al reacției să fie deplasat, porțiunea asimptotică a curbei putându-se apropia de o

altă valoare decât cea pentru enzima liberă din fig.nr.21.

Fig.Nr.21

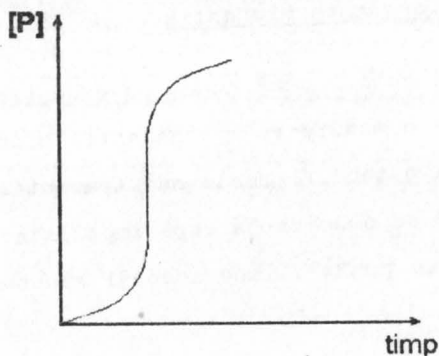
Variația concentrației produsului de reacție cu timpul,
pentru o reacție biocatalizată de o enzimă nativă



Rezultatul va fi o curbă ca în fig. nr. 22

Fig. Nr. 22

Modificarea concentrației produsului de reacție cu timpul,
pentru o reacție biocatalizată de o enzimă imobilizată



La începutul reacției biocatalitice se observă că concentrația produsului de reacție nu are nici un efect, dar pe măsură ce reacția avansează și produsul de reacție se acumulează, acesta se poate desprinde de pe suprafața enzimei, migrând în soluție.

Efectele de sarcină și cele difuzionale apărute astfel, pot duce la o concentrație locală crescută de produs, cu consecințe ca:

- reversibilitatea reacției;
- transformarea reacției într-una de echilibru;
- inițierea unei inhibări și scăderea corespunzătoare a vitezei de reacție.

I.5.1.6. Viteza maximă de reacție ($V_{\max}$)

$V_{\max}$ este dependentă de concentrația efectivă a enzimei, dar și de influența altor factori trecuți în revistă în acest capitol (concentrația enzimei, temperatura, pH, tărie ionică, concentrația substratului și a produsului de reacție etc.).

Valorile $V_{\max}$ pot fi măsurate și sunt în general apropiate de cele ale enzimelor libere. Totuși, $V_{\max}$ pentru o glucoamilază imobilizată s-au dovedit a fi de 10 ori mai mare decât pentru enzima liberă față de maltoză ca substrat, pe când la β -D-fructofuranozidaza inclusă în gel, valorile $V_{\max}$ scad la 1/10 din cea a enzimei libere.

I.5.1.7. Constanta Michaelis (K_M)

Toți factorii discutați până acum, cu excepția concentrației enzimei pot determina o modificare a constantei Michaelis după imobilizare, modificarea putând fi reală sau aparentă.

În tabelul nr.23 se observă că după imobilizare constanta Michaelis a unor enzime poate rămâne aceeași sau se poate modifica,

în funcție de procedeul utilizat.

Tabelul Nr. 25

Valori ale constantei Michaelis a unor enzime imobilizate

Enzima	Metoda de imobilizare	Substrat	K_M (mM)	
			Enzimă liberă	Enzimă imobilizată
Asparaginază	Includere (gel poli- acrilamidă)	L-asparagină	$1,8 \cdot 10^{-2}$	3,3
Urează	Includere (microcapsu- le cu membra- nă lichidă	Uree	3,4	$1,8 \cdot 10^2$
Ficină	Legătură ami- dică (pe CMC- azidă)	Esterul etilic al N-benzoil- argininei	20	2,0
Aminoacilază	Legare io- nică (DEAE- celuloză)	N-acetil-DL- metionină	5,7	3,5
	Alchilare (iodoacetil- celuloză)	N-acetil-DL- metionină	5,7	6,7
Tripsină	Legare ionică (DEAE-Sephadex)	TAME	0,12	2,5
	Legare amidică (pe Sepharoză- BrCN)	TAME	0,12	6,2

Determinarea lui K_M , care reflectă afinitatea dintre enzimă și substrat este foarte importantă, imobilizarea putând duce la scăderea sau la mărirea valorii acestui parametru.

O descreștere a lui K_M pentru o enzimă imobilizată are drept consecință o viteză mai mare de reacție, cele două mărimi fiind invers proporționale.

Pe de altă parte, o creștere a valorii K_M după imobilizare implică utilizarea unei concentrații de substrat mai mari, pentru a se menține aceeași viteză de reacție ca și în cazul enzimei libere.

Constanta aparentă K'_M poate scădea dacă sarcinile electrice ale substratului și suportului sunt opuse. Astfel, valoarea K'_M pentru ficină imobilizată prin legături amidice pe azida CMC (suport polianionic) scade în jur de 90% în comparație cu cea a enzimei libere, față de un substrat pozitiv ca esterul etilic al N-benzoil-L-argininei.

Alt exemplu de scădere a valorii lui K_M a unei enzime după imobilizare se observă la hidroliza maltozei cu glucoamilaza imobilizată pe un suport de TiO_2 activat. Scăderea este de 2 până la 20 ori și se explică prin creșterea concentrației substratului în microvecinătatea enzimei, datorită formării unui complex între maltoză și TiO_2 activat. Valoarea K_M pentru glucoamilază solubilă crește cu descreșterea masei moleculare a substratului. Astfel, dacă se folosește ca substrat maltoza se obțin valorile cele mai mari ale lui K_M (tabelul nr.26), pentru enzima liberă, în timp ce imobilizarea aduce o scădere substanțială a constantei Michaelis.

Rezultatele se pot explica printr-o mai mare difuzie a maltozei decât a amidonului sau a altor polimeri, care sunt cinetic defavorabili reacțiilor cu enzima solubilă.

Tabelul Nr. 26

Constante Michaelis pentru glucoamilază imobilizată

Substrat	K_M (g/l)	
	Enzimă liberă	Enzimă imobilizată
Amidon solubil	1,0	15,1
Amilopectină	1,2	16,0
Amiloză	3,0	16,5
Maltoză	10,8	4,87

Când sunt prezente atât efectele difuziei externe cât și ale celei interne, valoarea aparentă a lui K_M scade, după cum particula cu enzima poate fi înconjurată de un strat neagit (Nernst) de solvent în care concentrația substratului poate fi mai mică decât în restul soluției.

Acest efect poate fi diminuat prin scăderea dimensiunilor particulelor aductului suport-enzimă (tabelul nr.27),

Tabelul Nr. 27

Influența dimensiunilor particulelor asupra constantei Michaelis pentru glucoamilază imobilizată

Dimensiune medie a particulelor (μm)	K_M (g/l)
214	17,6
302	19,3
427	23,2
604	31,6

sau prin creșterea vitezei liniare a fluidului (tabelul Nr.28).

Tabelul Nr. 28

Influența vitezei liniare de agitare asupra constantei Michaelis pentru glucoamilază imobilizată, cu sirop de porumb 30% (în greutate) 40 DE (echivalent dextroză) ca substrat

Viteza liniară (cm/min)	K_M (% în greutate)
0,853	7,76
1,32	5,94
3,24	3,82
6,01	3,89
14,5	3,79

Efectele de difuzie internă sunt foarte importante pentru enzimele imobilizate în porii suportului ca și pentru cele incluse în geluri.

Modificările conformaționale ale moleculei enzimei ca și împiedicările sterice pot duce de asemenea la creșterea valorii K_M , datorită scăderii afinității dintre enzimă și substrat.

Aceste efecte sunt mai pronunțate în tehnicile de imobilizare covalentă, în care moleculele proteinelor sunt modificate chimic.

1.5.1.8. Concentrația substratului ([S])

Viteza de reacție poate fi influențată atât de factorii difuzionali cât și de modificările în concentrația efectivă a substratului, datorită sarcinilor electrice și interacțiilor electro-

statice.

Enzima fiind imobilizată pe un suport solid, substratul poate difuza din soluție către situsul activ al biocatalizatorului. Dacă viteza de difuzie a substratului este mai mică decât viteza sa de transformare enzimatică, viteza de reacție observată poate fi mai mică decât cea prevăzută pentru enzima nativă, pentru că nu toate moleculele de enzimă vin în contact cu substratul, ca în cazul reacției cu enzima solubilă (nativă). Acest fenomen se exprimă printr-un factor de efectivitate, η , definit ca un raport între viteza efectivă de reacție (v) și viteza V_{kin} în lipsa limitărilor impuse de transferul de masă, pentru care toate moleculele de enzimă sunt expuse la aceeași concentrație de substrat ca și în restul soluției:

$$v = \eta V_{kin} \quad (3)$$

Pentru o reacție enzimatică decurgând după cinetica Michaelis - Menten:

$$V_{kin} = V_{max}([S]/(K_M + [S])) \quad (4)$$

în care V_{max} , K_M și $[S]$ au semnificațiile indicate la pag. 209-210.

În prezența efectelor difuzionale, viteza observată, v , nu este adevărata viteză a reacției. Introducând factorul η în ecuația Michaelis - Menten (4), va rezulta:

$$v = \eta \left\{ V_{max} [S] / (K_M + [S]) \right\}; \quad (5)$$

$$1/v = 1/\eta \cdot V_{max} + K_M/\eta V_{max} [S]; \quad (6)$$

$$[S]/v = K_M/\eta V_{max} + [S]/\eta V_{max} \quad \text{și} \quad (7)$$

$$v = \eta V_{max} - v K_M/\eta [S] \quad (8)$$

Relațiile (6) - (8) indică dependența lui η de concentrația substratului.

Cinetica unei enzime imobilizată pe un material poros este guvernată de două efecte de rezistență difuzională la transportul de substrat:

A) rezistența la difuzia externă, datorată faptului că suprafața catalizatorului este cufundată în stratul lichid și

B) rezistența la difuzia internă, limitată de transportul substratului în porii mediului catalitic.

În cazul limitării difuziei externe, reacția chimică decurge după ce substratul s-a alăturat de suprafața catalizatorului. Deplasarea substratului în stratul înconjurător poate fi aproximată în majoritatea cazurilor ca un gradient liniar. Parțial, limitarea datorată difuziei externe poate fi micșorată prin creșterea vitezei de agitare a unei suspensii de particule cu enzimă imobilizată, sau prin creșterea debitului soluției de substrat trecută printr-o coloană cu enzimă imobilizată. De asemenea, micșorarea dimensiunilor particulelor sau grosimii membranei de suport au același efect. Cu limitările de transport intern procesul de difuzie decurge simultan cu reacția chimică, astfel încât ambele sunt cuplate în sens matematic și pot duce la o creștere neliniară a gradientilor de concentrație ai substratului cu mărirea porilor catalizatorului. Acest paralelism între reacția chimică și difuzia internă se poate explica prin faptul că atunci când o enzimă este introdusă într-un mediu poros, substratul trebuie să difuzeze în interiorul porilor, la centrul activi ai enzimei, pentru ca reacția să poată avea loc. Viteza reacției chimice per unitate de volum de enzimă imobilizată va scădea cu creșterea distanței dintre suprafața enzimei imobilizate și substrat, pe măsură ce acesta din urmă se consumă în timpul reacției. Din

același motiv, formarea produsului în structura poroasă și acumularea sa locală duce la apariția unei rezistențe difuzionale. Considerentele teoretice asupra difuziei interne au fost confirmate în numeroase studii experimentale, care au măsurat parametrii cinetici efectivi ai unor enzime imobilizate, utilizând o mare varietate de suporturi ca: filme de poliacrilamidă, membrane de colodiu, particule de sticlă, Sephadex, agaroză, rășini schimbătoare de ioni de diverse grosimi și porozități. Astfel, Goldman și colaboratorii au studiat cinetica membranelor de papaină-colodiu cu grosimi de: 470, 156 și 49 μm , folosind un substrat de amidă a N-benzil-L-argininei (BAA) și un substrat de diamidă a acidului N-acetil-L-glutamic (AGDA). Toate cele trei membrane de papaină prezintă o creștere liniară a activității cu creșterea grosimii membranei atât pentru AGDA cât și pentru BAA.

Axén și colaboratorii au arătat că în cazul particular al conjugatelor de chimotripsină - Sepharoză se observă o perturbare mare a valorilor constantei Michaelis efectivă față de enzima nativă.

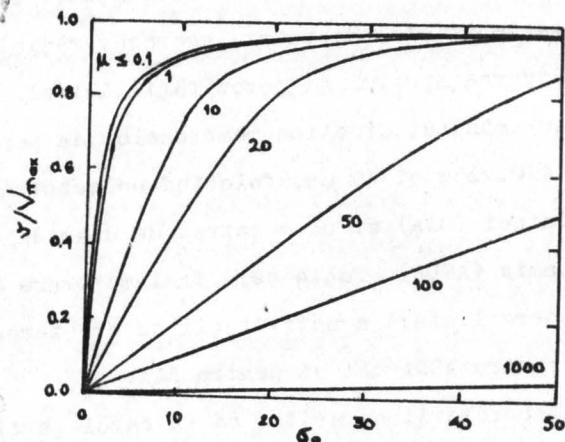
În cazul unei enzime foarte puternice ca glucozooxidaza imobilizată pe perle de sticlă poroasă, se detectează doar 6% din activitatea enzimatică totală. Limitările impuse de difuzia internă pot fi înlăturate sau micșorate prin mărirea dimensiunilor porilor suportului.

Toate studiile au arătat că în mod previzibil, o creștere a grosimii membranelor sau a diametrului particulelor se asociază cu o descreștere a factorului de efectivitate.

Dacă rezistența la difuzia externă și internă afectează simultan viteza reacției enzimaticе, contribuțiile relative ale celor doi factori se vor estima separat (fig.nr.23 și 24)

Fig nr. 23

Variația raportului $v/V_{\max}$ față de mărimea concentrației substratului în soluție (σ_0), pentru diferite valori ale modului de substrat pentru difuzia externă (μ)



σ = mărimea efectivă a concentrației substratului; ($[S]/K_m$);

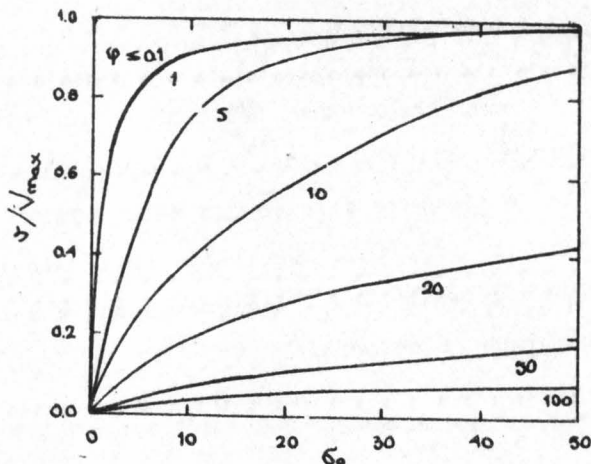
σ_0 = mărimea concentrației substratului în soluție ($[S_0]/K_m$);

μ = modulul substratului pentru difuzia externă

S-a observat că cele două efecte combinate (difuzia externă și internă) pot aduce aceleași limitări cinetice pentru o membrană cu enzimă la valori suficient de mici și suficient de mari ale concentrației substratului dacă reacția este de ordinul unu și respectiv zero.

Fig. nr. 24

Variația raportului $v/V_{\max}$ în funcție de mărimea concentrației substratului în soluție, C_0 , pentru diferite valori ale lui ϕ , pentru difuzia internă într-o membrană cu enzimă imobilizată



ϕ = modulul substratului pentru difuzia internă;

$\phi = l_1(V_{\max}/K_M D_s)^{1/2}$, în care

l_1 = grosimea membranei;

D_s = difuzibilitatea substratului în mediu poros

I.5.1.9. Concentrația inhibitorului ($[I]$)

Urmele de inhibitor nu reprezintă o problemă la începutul reacției; pe măsură însă ce aceasta avansează, inhibitorii acționând prelungit în soluție pot duce la dezactivarea enzimei. Sub influența efectelor difuzionale, inhibitorii enzimelor se comportă ei înșiși diferit în soluții sau în medii heterogene.

Ei pot determina nu numai o scădere a activității inerente a enzimelor, dar pot determina și epuizarea substratului.

Natura antagonică a interrelației dintre inhibarea chimică și limitările difuzionale a fost demonstrată în numeroase lucrări.

Astfel, Carlsson și colaboratorii au studiat efectul benzamidinei, un inhibitor competitiv al tripsinei.

Atât tripsina solubilă cât și cea imobilizată pe Sephadex prezintă aceeași inhibare față de substratul p-nitroanilidă a N-benzoil-L-argininei (BAPA).

Dacă însă se folosește ca substrat eterul etilic al N-benzoil-L-argininei (BAEE), tripsina imobilizată se inhibă mult mai puțin decât tripsina solubilă. Aceasta se explică prin efectele mult mai puternice de limitare difuzională pentru BAEE, care este hidrolizată rapid de tripsină. Observații asemănătoare au fost făcute pentru tartrat- și lactat-dehidrogenaza în soluție și imobilizate pe membrane de colodiu.

În acest context, denaturarea enzimei poate fi considerată ca un caz special de inhibare ireversibilă în timp.

Se poate deci trage concluzia că rezistența difuzională poate împiedica stabilitatea aparentă a unei enzime, după cum inhibarea activității biocatalitice prin denaturare poate diminua extinderea limitărilor difuzionale într-un sistem cu enzimă imobilizată.

În cazul în care produsul unei reacții enzimatice este un inhibitor competitiv, atât acumularea de produs cât și consumarea substratului în vecinătatea enzimei imobilizate trebuie luate în calcul. Aceste două efecte concurente se reflectă în mărirea factorului de efectivitate .

Valorile relativ scăzute ale vitezelor de reacție observate în aceleași condiții pot fi atribuite următoarelor trei efecte distincte:

- efectul intrinsec al inhibării prin produs;
- efectul limitărilor difuzionale legate de consumarea substratului și
- efectul de acumulare a produsului, care poate provoca el însuși o inhibare.

Efectul inhibării prin acumularea produsului de reacție prezintă un interes particular când produsul este acid sau bazic; în asemenea cazuri, reacția enzimatică poate determina o modificare locală a pH-ului, care în cazul enzimei imobilizate influențează viteza de reacție a substratului dacă enzima este legată în membrană sau în particule.

Din cele expuse în acest capitol se poate trage concluzia că alături de parametrii considerați, natura enzimei și suportului, ca și tehnicile de imobilizare folosite pot afecta activitatea biocatalizatorului imobilizat. De aceea studiile trebuie făcute pentru fiecare caz particular în parte, pentru a se ajunge la cei mai convenabili aducți cu valoare operațională pentru o anumită reacție biocatalizată.

I.6. Stabilitatea preparatelor de enzime imobilizate

Un avantaj major al imobilizării enzimelor este creșterea stabilității lor, parametru important pentru determinarea fezabilității acestor preparate în raport cu utilizările lor.

Important este ca prin imobilizare enzimele să-și păstreze nu numai activitatea inițială, dar și maximul activității lor pentru o perioadă mare de timp, deci să prezinte o viteză cât mai scăzută de inactivare.

I.6.1. Stabilitatea față de pH

S-a constatat că stabilitatea enzimei depinde de factorii responsabili ai modificărilor cineticii biocatalizatorilor.

S-a arătat de asemenea că efectele de partiție pot influența stabilitatea enzimelor imobilizate față de pH. Astfel, stabilitatea unor enzime ca: tripsina, chimotripsina, papaina (Goldstein, 1970) crește în mediu alcalin dacă sunt imobilizate pe suporturi polianionice și în mediu acid prin imobilizare pe suporturi policationice.

Efectele conformaționale ca și efectele difuziei interne pot fi responsabile de creșterea stabilității enzimei atât la pH alcalin cât și la pH neutru, ca în cazul glucoamilazei imobilizată pe silice poroasă prin cuplare covalentă (Cabral și colaboratorii, 1983).

I.6.2. Stabilitatea termică și la stocare

Imobilizarea poate avea ca efect menținerea, creșterea sau scăderea termostabilității enzimelor. O creștere se observă în foarte multe cazuri. Stabilitatea termică a enzimelor este influențată în special de efectele de difuzie. Aceste efecte sunt responsabile și de creșterea stabilității enzimelor imobilizate față de pH sau de agenții de denaturare (uree, EDTA etc.). S-a ajuns la concluzia (Chibata, 1979) că suportul trebuie să posede o dimensiune optimă a porilor, pentru a stabili enzima. Sunt mai puțin clare corelațiile dintre termostabilitate și metodele de imobilizare a enzimelor, dintre care includerea și cuplarea covalentă duc la îmbunătățirea stabilității biocatalizatorului.

Pe de altă parte, se observă la majoritatea enzimelor imobilizate prin adsorbție sau legare ionică o descreștere a termostabilității, asemenea preparate nefiind recomandabile pentru procese

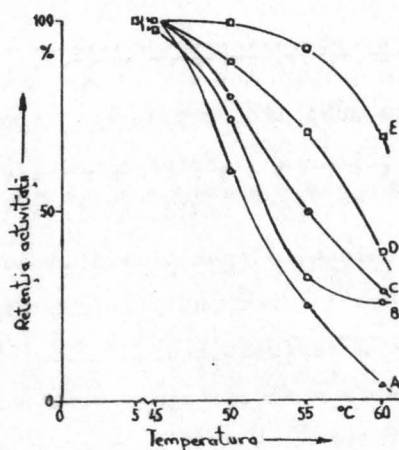
în care se cere o înaltă termostabilitate a enzimei.

Termostabilitatea mai depinde și de mediul în care se testează enzima.

În fig. nr. 25 se poate observa efectul atât al substratului (amidon, amidon hidrolizat) cât și al produsului de reacție (glucoză) asupra stabilității termice a glucoamilazei imobilizată pe silice poroasă activată cu Ti^{IV} , prin cuplare covalentă

Fig. Nr. 25

Curbele termostabilității pentru glucoamilaze solubilă și imobilizată



- (A) - enzima solubilă incubată cu tampon-acetat;
- (B) - IME (enzima imobilizată) incubată cu tampon acetat
pH = 4,5;
- (C) - IME incubată cu soluție amidon solubil 1 g/l;
- (D) - IME incubată cu soluție amidon hidrolizat 1 g/l
cu 40 DE (echivalent-dextroză);
- (E) - IME incubată cu soluție de glucoză 1 g/l

Se observă că glucoamilaza imobilizată are o termostabilitate crescută față de enzima liberă la peste 50°C; stabilitatea poate fi atribuită atât substratelor, cât mai ales produsului de reacție, care protejează enzima de denaturare.

Faptul că enzimele imobilizate sunt stabile la temperaturi joase (4°C) le mărește și stabilitatea la stocare în aceste condiții.

Un alt factor care influențează stabilitatea la stocare este metoda de imobilizare; astfel, imobilizarea covalentă pe suport are efectul cel mai bun în acest sens, probabil datorită tăriei legăturilor enzime-suporturi. Totuși enzimele imobilizate prin interacții puternice cu suportul pot avea o stabilitate variabilă, în funcție de natura soluției în care sunt păstrate.

I.6.3. Stabilitatea operațională

Acest factor este unul dintre cele mai importante proprietăți care condiționează utilizarea practică a unei enzime imobilizate.

În condiții operaționale normale, activitatea enzimei scade datorită denaturării sale ca și posibilității desprinderii, blocării catalizatorului de pe suport. Ocazional, la suporturi poroase, se mai observă și un blocaj reversibil al porilor. Desprinderea enzimei de pe suport poate fi o consecință a eroziunii acestuia sau a ruperii legăturilor dintre enzimă și suport, ca și a „scufundării” suportului în gel.

În primul caz, viteza de desprindere a enzimei depinde de fluxul soluției de substrat. Metodele uzuale de cuplare covalentă conduc la preparate foarte stabile, datorită tăriei legăturii covalente, pe când în cazul legăturilor fizice (adsorbție) sau ionice, desprinderea enzimei (solubilizarea sa) depinde de o mulțime de factori: temperatură, pH, tărie ionică și condițiile fizice

operaționale (viteza fluxului soluției de substrat).

Abraziunea, ca și frecarea sunt alți factori care pot duce la scăderea activității enzimelor imobilizate, mai ales a celor fixate pe suporturi organice. Tipul de reactor (cu agitare mecanică sau în pat compact) poate fi un factor determinant pentru retenția activității enzimei imobilizate.

I.6.4. Biodegradabilitatea

Contaminarea microbiană poate fi alt factor care micșorează activitatea operațională a unui preparat de enzimă imobilizată.

La temperaturi înalte, acest efect nu este important. Dacă imobilizatul are limite difuzionale, se poate observa o scădere aparentă slabă a activității în lipsa transferului de masă.

II. IMOBILIZAREA SISTEMELOR ENZIMATICE MULTISECVENTIALE

În ultimul timp au căpătat o deosebită importanță aducții cu enzime co-immobilizate, pentru reacții multisevențiale, asemenea sisteme fiind modele de studiere a metabolismelor, dar având și o importanță practică.

Se știe că într-un proces metabolic produsul unei reacții enzimatice devine substrat pentru următoarea secvență (treaptă) de reacție. Pentru asemenea procese prezintă importanță natura diverselor enzime asociate mai mult sau mai puțin în agregate sau legate de o membrană, având o activitate mai mare sau mai mică față de mediul în care se găsesc.

S-a demonstrat astfel că după centrifugarea extractelor de celule de *Euglena*, practic toate enzimele s-au găsit în diverse straturi de celule, de unde s-a tras concluzia că în celule enzimele nu sunt libere sau nelegate.

Sistemele de enzime pot fi asociate sau formează adevărate complexe enzimatice. În asemenea complexe nu apare un singur mecanism de reacție. De aceea aceste complexe corespund mai multor reacții parțiale, ca de exemplu: acetyl-CoA-carboxilaza, sintetazele acizilor grași (formate din șapte enzime care în cazul complexului din drojdie, devin inactive dacă sunt separate); altele, ca cele ce compun -cetoacid-dehidrogenazele rămân active și după disociere.

Pentru a se face o distincție, se folosește termenul de „sisteme enzimatice multisevenționale” pentru cele descrise în acest capitol, pentru a-l deosebi de termenul „complex multienzimatic” caracteristic aglomerărilor naturale de enzime din celule.

Sunt două metode de a crea sisteme enzimatice multisevenționale immobilizate:

a) prin imobilizarea diferitelor enzime pe aceeași particulă de suport și

b) prin imobilizarea diferitelor enzime pe particule separate urmată de amestecarea particulelor într-un reactor pentru reacții multisevenționale (în trepte).

Se pot astfel co-imobiliza prin metoda a):

- hexokinaza și gluco-6-fosfat-dehidrogenaza prin legare pe Sepharoză activată cu BrCN sau prin co-includere în gel de poliacrilamidă-acid poliacrilic
- un sistem trienzimatic de β -galactozidază-hexokinază-gluco-6-fosfat dehidrogenaza pe Sephadex activat cu BrCN;
- un sistem de trei enzime: malat-dehidrogenaza-citrat sintetaza-lactat-dehidrogenaza pe Sephadex activat cu BrCN sau co-incluse în gel de poliacrilamidă;
- un sistem de amiloglucozidază și glucozooxidază legate covalent pe Sepharoză 4B activată cu BrCN.

Indiferent de metoda de imobilizare folosită (fizică - a includerii în geluri sau chimică - prin legare covalentă), enzimele se pot fixa pe suport pe rând sau într-o singură etapă.

II.1. Considerații generale privind prepararea și utilizarea sistemelor enzimice multisevenționale imobilizate

II.1.1. Alegerea suportului și a tehnicii de imobilizare

Teoretic, orice suport sau tehnică pot fi utilizate pentru obținerea unor asemenea sisteme.

Utilizând suporturi poroase, la tehnica includerii, apar probleme legate de limitările difuzionale; dacă tehnicile de imobilizare nu creează nici un fel de dificultăți, analiza cinetică este

în schimb complicată.

Astfel, în modele de sisteme biologice ce folosesc Sephadex G-50, enzimele se leagă numai de suprafața suportului.

II.1.2. Activitatea enzimelor

În cazul unei cuplări simultane a tuturor speciilor enzimatice este greu să se prevadă viteza de formare a produsului final. Aceasta se datorește unei concurențe dintre enzimele legate de suport, iar o scădere a cantității uneia dintre aceste enzime nu duce neapărat la o creștere comparabilă a randamentului de cuplare cu suportul al celorlalte. Sistemul cu proprietăți cinetice previzibile nu se poate obține nici chiar numai cu două enzime, erorile crescând enorm la cel cu trei enzime.

Enzimele foarte stabile pot fi legate pe rând, prin procedee succesive de imobilizare. În acest caz, probabilitatea de a obține sisteme cu proprietăți cinetice previzibile este mult mai mare.

Dacă se utilizează un gel preactivat, adăugând agentul de cuplare la soluția enzimei, se poate evita o cuplare proteină-proteină.

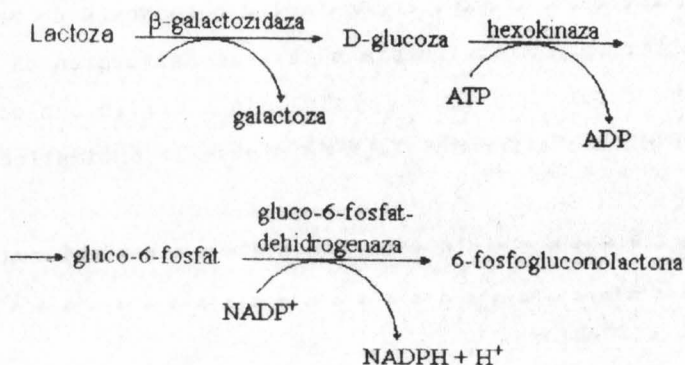
Raportul dintre activitățile diferitelor enzime este foarte important pentru cinetica sistemului. Este posibilă și o adsorbție nespecifică a intermediarilor pe suport, de asemenea, cu cât activitatea enzimelor co-imobilizate va fi mai mare, cu atât mai ușor se obțin aducți cu același nivel de stabilitate.

II.1.2.1. Determinări de activitate

Pentru a determina activitățile individuale ale enzimelor co-imobilizate într-un suport sub formă de gel, se începe cu enzima din ultima secvență de reacție.

Astfel, pentru sistemul de trei enzime β -galactozidază-

hexokinază-gluco-6-fosfat-dehidrogenaza, corespunzător următoarei reacții multisevenționale:



se determină întâi gluco-6-fosfat-dehidrogenaza prin adăugarea unui exces de gluco-6-fosfat și NADP^+ . În etapa următoare, se determină hexokinaza în exces de glucoză, ATP și în prezența gluco-6-fosfat-dehidrogenazei libere etc.

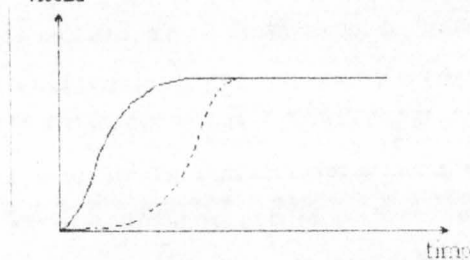
În fig. nr. 26 este ilustrată dependența vitezei de reacție de timp, pentru un sistem de două enzime co-immobilizate.

Fig. Nr. 26

Variația vitezei de reacție cu timpul în sistemul:

hexokinază-gluco-6-fosfat-dehidrogenaza

viteza



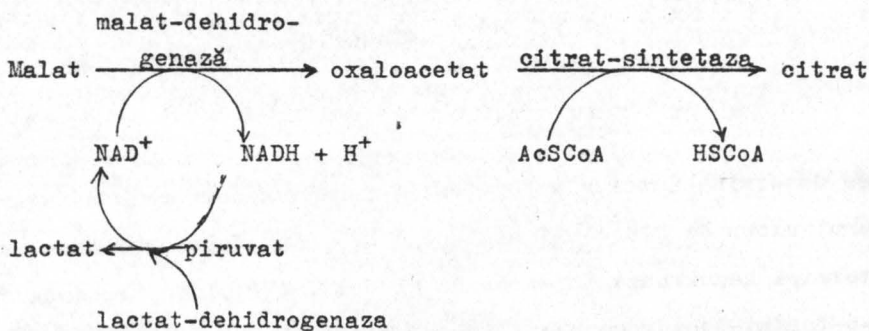
---- sistemul de enzime solubile; — sistemul de enzime

co-immobilizate pe copolimer de acrilamidă/acid acrilic, utilizând o carbodiimidă solubilă

Din această figură se observă creșterea apreciabilă a vitezei globale de reacție la sistemul celor două enzime co-immobilizate.

Dacă se lucrează cu sisteme ce includ o secvență de reacție defavorizată termodinamic, trebuie să existe asigurarea că intermediarul nu va satura următoarea enzimă din lanț; în caz contrar, nu se observă nici o diferență față de sistemele enzimaticice libere neimmobilizate.

Acesta este cazul cu sistemul de enzime: malatdehidrogenază-citrat-sintetază:



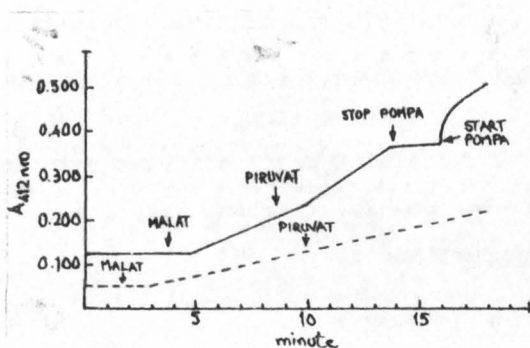
În care etapa catalizată de malat-dehidrogenază este termodinamic defavorizată.

Dacă se utilizează concentrații de saturare în malat, viteza de reacție a sistemului enzimatic liber va fi egală cu cea a sistemului immobilizat, pentru că citrat-sintetaza în sistemul liber (soluție) nu prezintă aceeași concentrație în oxaloacetat ca cea găsită în microvecinătatea citrat-sintetazei immobilizate. Efectul catalitic al malat-dehidrogenazei va crea o concentrație constantă de oxaloacetat în microvecinătatea enzimei și va duce la descreșterea gradientului concentrației de oxaloacetat departe de situsul său reactiv. Se observă o dublare a vitezei de formare a citratului în comparație cu cea a amestecului de enzime libere.

La concentrații mici de malat, apar diferențele dintre sistemul enzimatic imobilizat și același sistem în stare liberă (solubilă). Deplasarea favorabilă a echilibrului etapei termodinamic defavorizate poate avea loc și cu o enzimă auxiliară. În fig.nr. 27 se observă diferențele între vitezele de reacție ale secvențelor pentru sistemul de enzime libere și cel al enzimelor co-imobilizate, sistemul imobilizat fiind aproape cu 100% mai eficient.

Fig. Nr. 27

Reacția trisevențială catalizată de sistemul trienzimatic: malat-dehidrogenază-citrat-sintetază-lactat-dehidrogenază pentru sistemul de enzime libere și sistemul co-imobilizat în poliacrilamidă



----- sistemul de enzime libere;

_____ sistemul co-imobilizat în poliacrilamidă

Sistemul de reacție în flux continuu s-a întrerupt prin oprirea pompei peristaltice

Distanțele medii statistice dintre moleculele de malat-dehidrogenază și citrat-sintetază sunt mai scurte dacă enzimele sunt

fixate pe suport, față de enzimele solubile. Aceasta duce în sistemul imobilizat la un gradient mai accentuat de concentrație a oxaloacetatului și la un transfer de masă mai ridicat, ceea ce are drept consecință reacția de condensare a oxaloacetatului cu acetil-CoA și crește efectivitatea etapei de formare a citratului.

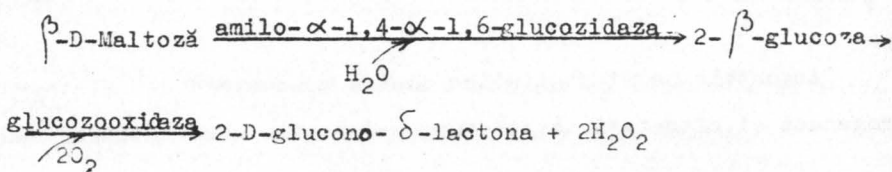
Această îndepărtare rapidă a oxaloacetatului din echilibrul defavorizat face să crească viteza de reacție a malatului și implicit viteza reacției globale. Efectul nu este rezultatul difuziei Nernst a straturilor, ci o consecință a proximității enzimelor co-imobilizate. Dacă se adaugă la sistem piruvat (fig.nr.27), lactat-dehidrogenaza (enzimă auxiliară) fixată pe suport va cataliza oxidarea lui NADH la NAD^+ . Aceasta crește eficiența sistemului co-imobilizat în comparație cu amestecul de enzime libere, de peste 400%.

Deci, alături de creșterea concentrației în oxaloacetat, echilibrul poate fi deplasat și prin mărirea concentrației în co-enzimă (NAD^+).

Acest sistem a fost studiat pentru a se crea un model pentru ciclul enzimatic Krebs. Modelul a fost verificat prin studii cu mitochondria în care are loc ciclul Krebs, datorită prezenței enzimelor respective compartimentate.

II.1.2.2. Studii de pH

S-a studiat activitatea unui sistem de două enzime co-imobilizate pe Sepharoză (amilo- α -1,4- α -1,6-glucozidaza + glucozooxidaza) în funcție de pH:



S-au observat următoarele:

- luate separat, atât în soluție cât și imobilizate individual, cele două enzime prezintă valori ale pH-ului optim de 4,8 (amilo- α 1,4- α -1,6-glucozidaza) și 6,4 (glucozooxidaza);

- amestecul celor două enzime libere (solubile) prezintă un pH optim al soluției globale, disecvențiale, de 5,4;

- co-imobilizând cele două enzime pe aceleași particule de Sepharoză, pH-ul optim al reacției globale se deplasează la 5,7.

Această deplasare depinde de raportul dintre activitatea primei și celei de a doua enzime și are drept consecință creșterea concentrației de glucoză în microvecinătatea celei de a doua enzime, căreia îi mărește activitatea în comparație cu cea a enzimei solubile. Această acumulare locală a intermediarilor dintr-o reacție multisevențială în fază solidă (cu enzime co-imobilizate) se datorește în bună măsură și efectului de rezistență la difuzie, absent sau diminuat în cazul sistemelor enzimatiche solubile.

II.2. Aspecte practice

Procese analitice sau industriale ce includ utilizarea unor sisteme enzimatiche multisevențiale se pot efectua în coloane, pe Hollow-fiber sau în reactori enzimatici propriu-ziși. Alegerea parametrilor de reacție și a instalațiilor depinde de cele două moduri de co-imobilizare: a) pe aceeași particulă de suport și b) pe particule separate.

II.2.1. Utilizarea enzimelor co-imobilizate pe aceleași particule de suport

În general, asemenea sisteme fac să crească viteza primei etape a reacției și se folosesc de obicei în reactoare ce permit

un flux înalt de alimentare.

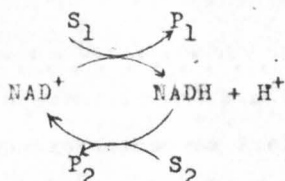
În cazul unor reacții multisevențiale care includ și o etapă termodinamic defavorizată, se preferă de asemenea acești aducți.

Dacă următoarea etapă enzimatică este favorizată energetic, atunci datorită efectelor de proximitate apărute la enzimele co-imobilizate pe aceeași particulă, procesul global va avea loc cu o viteză comparabilă cu cea observată în cazul în care enzimele sunt immobilizate pe particule separate, ca în exemplul sistemului de malat-dehidrogenază + citrat-sintetază + lactat dehidrogenază, examinat mai sus. Același lucru se observă la sistemul gliceraldehid-3-fosfat-dehidrogenază + fosfoglicerat-kinază.

În procesele în care este necesară conversia totală a substratului, aranjamentul moleculelor de enzimă pe aceeași particulă de suport poate fi avantajos, mai ales când se operează cu concentrații limitate de substrat.

Alt avantaj al acestei metode de co-imobilizare se observă în cazurile în care pH-ul mediului supernatant se poate modifica (de exemplu în terapia de substituție, când enzimele immobilizate se injectează în circulația sângelui). În acest caz, pH-ul optim operațional se poate atinge prin ajustarea raportului dintre activitățile enzimelor respective.

În sisteme dependente de coenzime, în care coenzima se poate regenera prin însăși immobilizarea sistemului enzimatic, alternativa co-imobilizării pe aceeași particulă este mai avantajoasă, deoarece coenzima poate fi menținută în vecinătatea particulei. Prin limitarea vitezei de difuzie a coenzimei, ea poate fi folosită la un număr mare de transformări, economicitatea procedurii fiind ridicată:



S_1 și S_2 = substrat
 P_1 și P_2 = produși de
 reacție

Procedeul de co-imobilizare pe aceeași particulă este favorabil pentru substrat intermediare cu molecule mari, deoarece acțiunea catalitică a primei enzime din secvență face molecula substratului steric accesibilă pentru cea de a doua enzimă. Este cazul hidrolizei enzimatică a amidonului la maltoză, reacție în două trepte. β -Amilaza și pullulanaza se leagă covalent pe un copolimer reticulat de acrilamidă - acid acrilic, folosind o carbodiimidă solubilă.

Hidroliza legăturilor α -1,4 din β -amilază face ca legăturile α -1,6 din amilopectină să fie disponibile pentru hidroliza cu pullulanază.

II.2.2. Utilizarea preparatelor de enzime co-imobilizate pe particule separate de suport

În literatură se găsesc destule exemple de sisteme enzimatică multisevențiale, care se imobilizează pe particule separate de suport, ca de exemplu: hexokinaza + fosfoglucoizomeraza + fosfofructokinaza + aldolaza.

Asemenea preparate sunt funcționale cu atât mai mult cu cât se pot menține sub control activitățile enzimelor imobilizate.

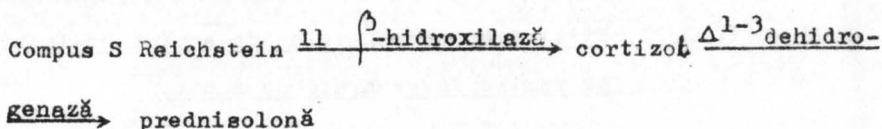
Această imobilizare separată este avantajoasă pentru reacțiile multisevențiale în care una din enzime este mai sensibilă la denaturare decât celelalte, aductul ce conține această enzimă fiind folosit în cantitate mai mare.

Majoritatea reacțiilor multisevențiale includ formarea sau consumarea de protoni, creșterea concentrației de protoni în microvecinătatea enzimei seconvențiale imobilizate putând duce la denaturarea ei. De aceea se preferă să se lucreze cu enzime imobilizate pe particule diferite.

Aceste preparate pot fi utilizate în reactoare-cuve cu agitare sau în reactoare-coloană cu „hollow-fibers”.

Uneori este însă necesară aranjarea enzimelor în straturi separate, în reactoare-coloane individuale.

Acest lucru se recomandă în cazurile în care substratul corespunzător unei enzime seconvențiale inhibă altă enzimă din ciclul de reacții, când reacțiile catalizate de enzimele imobilizate separat necesită condiții foarte diferite pentru o activitate biocatalitică optimă, sau când este necesar un control strict al fiecărei etape enzimatice a procesului general de conversie. Un asemenea aranjament îl necesită procesul de transformare în două etape a steroizilor:



Prepararea unor straturi duble de enzime imobilizate poate fi relativ simplă dacă se folosește același suport și aceeași tehnică de imobilizare. În cazul a două feluri de particule sferice, cu raze diferite (R_1 și R_2) și cu concentrații diferite de enzime, având $V_{\max 1}$ și $V_{\max 2}$, sistemul va fi caracterizat prin relațiile:

$$\xi_1 / \xi_2 = K_1 / K_2 \quad \text{și}$$

$$\phi_2 / \phi_1 = R_2 / R_1 (V_{\max 1} / V_{\max 2})^{1/2}$$

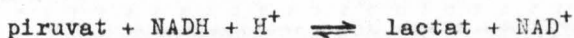
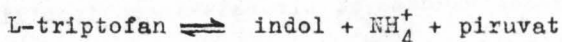
în care ε_1 și ε_2 = factori de efectivitate pentru o cinetică de ordinul unu, iar ϕ_1 și ϕ_2 = nodulii substratelor pentru difuzia internă.

Valorile corespunzătoare ale lui K_m și V_{max} se obțin prin măsurători cinetice, iar razele particulelor se pot măsura cu ușurință.

Prezența efectelor difuzionale poate interfera cu dependența constantelor de viteză ale reacțiilor enzimatice de temperatură.

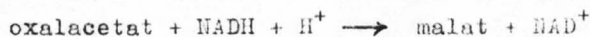
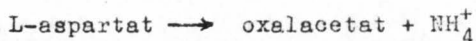
II.2.3. Exemple de sisteme enzimatice multisecvențiale co-imobilizate pe aceleași particule de suport

A) Un sistem format din triptofanază și lactat-dehidrogenază poate fi folosit în determinări spectrofotometrice ale L-triptofanului, după schema:



Ambele enzime s-au co-imobilizat pe Sepharoză activată cu BrCN. Avantajul metodei constă în obținerea unui sistem în care enzimele sunt în proximitate, ceea ce crește rapiditatea determinării și sensibilitatea înaltă a metodei la concentrații mici de substrat față de prima enzimă (triptofanaza).

B) Un sistem similar este utilizat la co-imobilizarea aspartat-aminotransferazei și malat-dehidrogenazei pentru microdozarea L-aspartatului:



Sensibilitatea preparatului de enzime co-imobilizate este de

10 ori mai mare în comparație cu aspartat-aminotransferaza imobilizată separat și malat-hidrogenaza liberă, în soluție.

Sistemele de enzime co-imobilizate pot servi și la fabricarea termistorilor enzimatici, amplificând răspunsul caloric la prima secvență a reacției, crescând astfel sensibilitatea determinării față de concentrații joase de substrat. Astfel, semnalul caloric obținut la reacția cu glucoză într-un termistor enzimatic (filat) cu glucooxidază și catalază co-imobilizate este considerabil superior celui obținut cu glucooxidaza imobilizată.

II.2.4. Exemple de enzime co-imobilizate pe particule separate de suport

A) Deși mai puțin folosite, asemenea sisteme și-au arătat utilitatea. Astfel, pentru determinarea spectrofotometrică a piruvatului și a fosfoenol-piruvatului, s-a folosit un reactor cu structuri duble de lactat-dehidrogenază și piruvat-kinază imobilizate separat pe perle de sticlă prin diazotare. Imobilizatele s-au introdus în două reactoare separate, cu pat compact.

B) Uneori nu se observă diferențe operaționale mari la utilizarea celor două tipuri de sisteme (enzime co-imobilizate pe aceleași particule sau pe particule separate).

Astfel, pentru analiza zaharozei, s-au co-imobilizat invertaza și glucooxidaza prin legături covalente, fie pe suprafața aceluiași tub de Nylon, fie pe tuburi separate, care au fost apoi alternate în reactor.

Rezultatele analitice similare au fost explicate prin faptul că la hidroliza zaharozei se formează α -D-glucoză care prin rotație se transformă în β -D-glucoză înaintea etapei de oxidare cu glucozooxidaza.

III. SISTEME DE ENZIME SI COENZIME CO-IMOBILIZATE

Coenzimele sunt grupări prostetice ale enzimelor sau specii moleculare de natură organică sau anorganică, care interacționează cu centrele active ale enzimelor, obligatorii pentru conversia unui substrat (S) la produsul reacției enzimatice (P).

Rolul coenzimelor (cofactori, cofermenți) este de a activa centrul activ al enzimelor, ca rezultat al creșterii potențialului reactiv al resturilor de aminoacizi din secvența proteinelor.

Coenzimele pot fi grupări prostetice ale enzimelor (partea neproteică) ca FAD din glucozooxidază. Acestea se pot imobiliza pe suporturi insolubile, fără probleme deosebite.

Altele reprezintă partea ușor disociabilă a enzimelor (NAD, NADP, ADP sau ATP). Acestea se desprind ușor de apoenzimă (partea proteică a enzimei), ca de exemplu NAD care se reduce la NADH și care la rândul său se va oxida pe altă apoenzimă, regenerându-se NAD.

Imobilizarea numai a apoenzimelor legate de coenzime ușor disociabile este puțin eficientă în absența celei de a doua apoenzime, care să asigure regenerarea cofactorului.

După cum se știe, după specificitatea lor de reacție, enzimele au fost clasificate în:

- 1) Hidrolaze (pentru reacții de hidroliză)
- 2) Liaze (eliminări și adiții)
- 3) Izomerase (izomerizări)
- 4) Transferaze (transfer de grupări funcționale între diverse substraturi)
- 5) Oxidoreductaze (pentru reacții de oxido-reducere)
- 6) Ligaze sau sintetaze (reacții cu formare de noi legături)

Coenzimele, la rândul lor sunt de două tipuri:

- coenzime catalitice
- coenzime stoechiometrice

III.1. Coenzimele catalitice

Aceste coenzime se regenerează complet după fiecare reacție sau ciclu de reacții biocatalitice. În cazul unor ioni metalici de tipul M^+ și M^{2+} , funcția lor biochimică nu pune probleme serioase pentru biotehnologie dacă sunt ușor dissociabile și ușor de recuperat. În cazul coenzimelor organice (care se pot lega de apoenzime prin legături puternice covalente sau necovalente și care deci rămân legate în cursul biosintezelor) apar probleme la proiectarea bioreactoarelor.

Așa de exemplu, proiectantul trebuie să știe că glucozooxidaza conține FAD, pe când glucoamilaza, glucoizomeraza, aminoacilaza și proteazele nu conțin asemenea coenzime legate în moleculele lor.

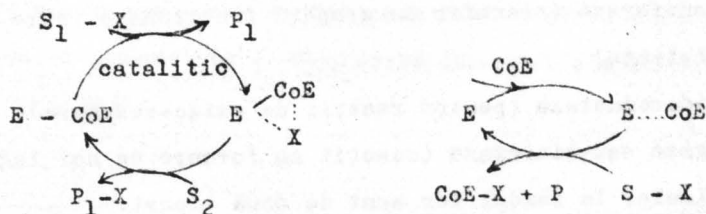
III.2. Coenzimele stoechiometrice

Acestea sunt cofactori pentru reacțiile din categoriile 4-6 (pag. 257).

În fig.nr.28 este indicat modul de reacție a unei coenzime stoechiometrice.

Fig. Nr. 28

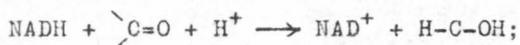
Modul de reacție al coenzimelor stoechiometrice



Coenzimele stoechiometrice difuzează ușor și acționează ca purtătoare de grupe X, apoi (datorită ușoarei difuzibilități) funcționează ca un co-substrat. Asemenea coenzime sunt: NAD(H), NADP(H), ADP, ATP, AMP, CoA, acidul tetrahidrofolic. Cu excepția ultimului, restul sunt nucleotide. Într-o reacție enzimatică simplă, asemenea coenzime determină un circuit al grupei transferate.

Mai jos se dă exemplul unor reacții ce necesită 4 coenzime stoechiometrice (adenozin-nucleotide):

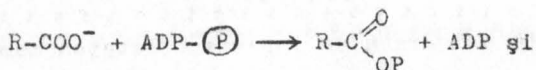
a) - implică NAD-dehidrogenaza legată



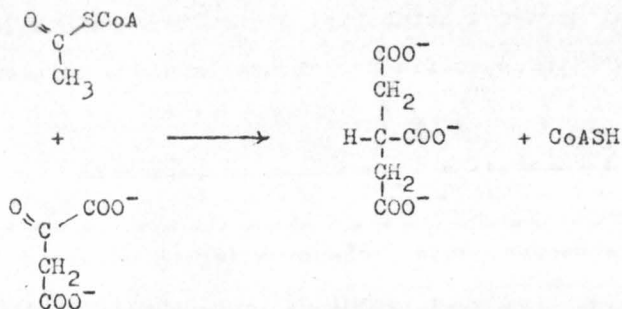
b) - implică o hidroxilază NADPH - dependentă:



c) - acetil-activarea prin ATP:



d) - acetilarea care implică CoA- funcționând ca purtător (transportor) de grupe acil:



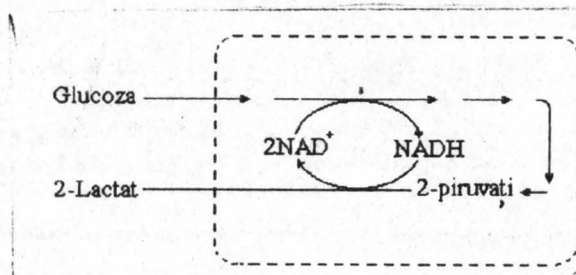
În sistemele biologice, coenzimele stoechiometrice funcționează ca purtători de grupări, care circulă prin difuzie liberă,

de la căile metabolice care generează gruparea la căile metabolice care o solicită. De exemplu, ADP este fosforilat în mitocondrii și apoi transportat la sistemul enzimatic biosintetic pentru activarea precursorilor macromoleculelor.

Cel mai sugestiv exemplu al unui asemenea proces ciclic, regenerativ, este rolul NAD în toate procesele fermentative (fig. nr.29).

Fig.Nr. 29

Reprezentarea schematică a celulei biologice (din mușchi) în cursul glicolizei



Retenția NAD(H) este asigurată de impermeabilitatea membranei de plasmă (linie punctată), în timp ce regenerarea NAD(H) este asigurată de dehidrogenazele cuplate în sistem

În general, numai asemenea metaboliți pentru care există în membrană un sistem purtător specific pot difuza în afara celulelor.

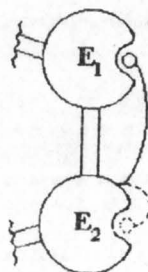
III.3. Co-imobilizarea enzimelor și coenzimelor

În fig.nr.30 este schematizată o coenzimă legată covalent prin intermediul unui „spacer” (ca restul de 6-aminohexilcarboximetil) de una din cele două enzime diferite co-reticulate (E_1 și E_2) și care poate acționa asupra centrilor activi ai ambelor

proteine

Fig. Nr. 30

Două enzime reticulate, cu o coenzimă cuplată printr-un „spacer”

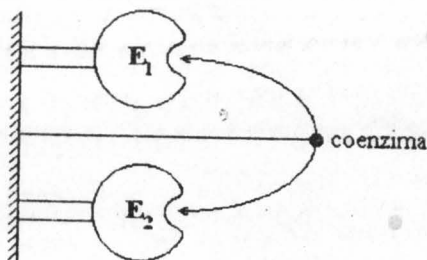


Un asemenea sistem format din două enzime diferite și o coenzimă legată doar de una din ele, este o simplificare adoptată în scopuri statistice.

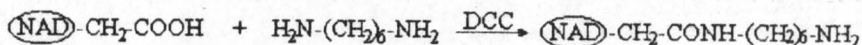
Un alt caz, mult mai frecvent este reprezentat de un sistem de două enzime diferite (E_1 și E_2) imobilizate pe același suport cu coenzima, care joacă în acest caz rolul de cofactor pentru ambele molecule de proteine. Fixată pe suport la capătul unui „spacer” suficient de lung, coenzima va putea acționa simultan asupra centrilor activi ai ambelor enzime (fig.nr.31).

Fig. Nr. 31

Un sistem de două enzime și o coenzimă co-imobilizate pe suport



Înainte de a imobiliza coenzime pe suport, este necesară modificarea acestora prin introducerea unui „spacer” suficient de lung. De exemplu de la NAD se obține întâi carboximetil-NAD care se condensează ulterior cu 1,6-hexandiamina, în prezența unei carbodiimide:

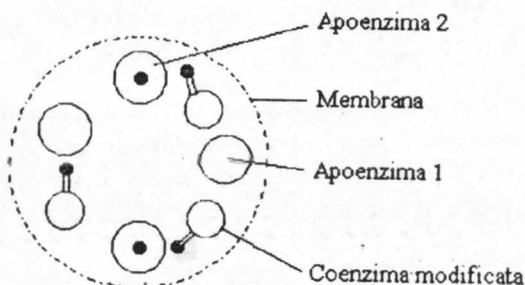


DCC = dicitohexilcarbodiimida

Gruparea -NH_2 de la capătul „spacerului” poate reacționa cu un suport preactivat (de exemplu, Sepharoză sau celuloză activate cu BrCN), imobilizându-se astfel coenzima.

Dacă se folosește procedeul fizic al includerii în membrane semipermeabile se va obține un sistem în care, în interiorul membranei vor fi incluse, în mediu apos, coenzima modificată cu un „spacer” și cele două apoenzime (Fig. nr.32).

Fig. Nr. 32



Prin modificarea coenzimei, masa sa moleculară se mărește, împiedicându-se astfel difuzarea ei în exteriorul membranei. Coenzima neimobilizată (devenită insolubilă prin modificarea moleculei) și apoenzimele în exces se îndepărtează prin ultrafiltrare. Coenzimele imobilizate în acest fel au fost folosite pentru

prima oară în scopuri industriale la obținerea L-aminoacizilor.

Deși se pot co-immobiliza enzime și coenzime și prin microencapsulare și în lipozomi, aceste preparate nu pot fi folosite în instalații industriale.

Pentru modificarea coenzimelor în scopul dublu al măririi moleculei (insolubilizare) și al introducerii unui „spacer” reactiv, se mai pot folosi și alți reactivi: PEG (polietilenglicol), polilisină, polietilenincină și dextran.

Astfel, în scopuri industriale se folosește un PEG cu masa moleculară de aproximativ 20.000.

În toate cazurile cuplările coenzimelor modificate cu suportul activat se fac cu carbodiimidă, sau prin alte metode descrise în capitolul referitor la immobilizarea chimică a enzimelor.

III.4. Strategii în utilizarea co-immobilizatelor de enzime și coenzime

Utilizare practică a coenzimelor stoechiometrice.

Coenzimele fiind reactivi foarte scumpi, s-au dezvoltat în principal două opțiuni majore care limitează difuzia acestor cofactori (în cazul coenzimelor stoechiometrice), permițând și regenerarea lor „in situ”, opțiuni ce vor fi descrise mai jos.

III.4.1. Membrane speciale și coenzime native

Se pot folosi membrane selective în raport cu dimensiunile moleculelor coenzimelor, fabricate după modelul celor biologice care conțin purtători chimici ce operează ca transportori activi sau pasivi. Retenția printr-o membrană poroasă simplă, ca într-un reactor cu „Hollow-fiber” nu are o semnificație practică deosebită, deoarece coenzimele (cu mase moleculare de 400-1000) pot

avea adesea dimensiuni similare cu cele ale substratelor și produșilor de reacție, chiar dacă permeabilitatea unor asemenea membrane este mică.

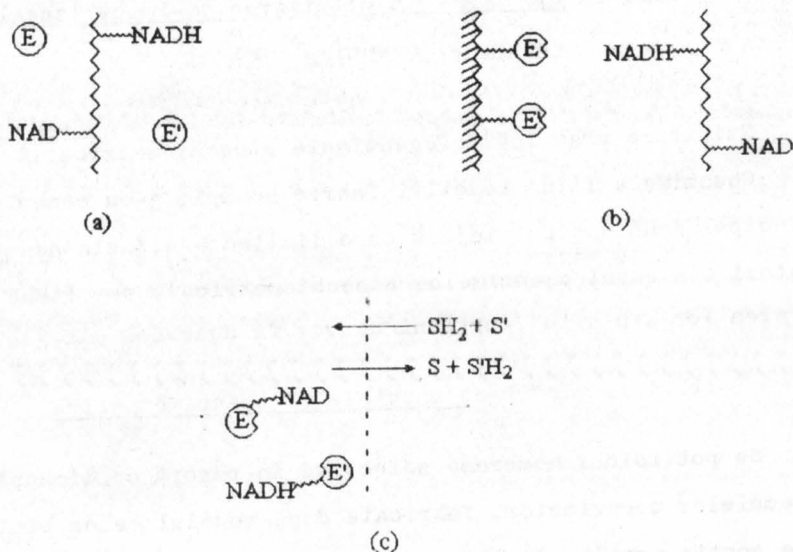
III.4.2. Membrane pentru coenzime cu masă moleculară mare

Această strategie se profilează ca una aplicabilă industrial pretându-se la retenția și regenerarea enzimelor.

După cum se observă din fig. nr. 33, coenzimele macromoleculare solubile (nemodificate), pentru reacții redox, pot avea trei configurații.

Fig. Nr. 33

Trei posibile configurații pentru retenția și regenerarea NAD(H) macromolecular într-un reactor cu enzimă.



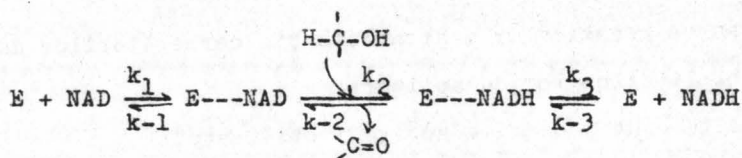
a) Enzime solubile, NAD(H) imobilizat; b) Enzime imobilizate, NAD(H) imobilizat. c) Enzime solubile cuplate intermolecular cu NAD(H)

Coenzimele insolubilizate pot fi considerate în același mod.

În cazul unor suporturi insolubile, cu suficientă mobilitate termică, co-immobilizarea enzimelor și coenzimelor poate deveni funcțională.

III.5. Mecanismele reacțiilor enzimatice în prezența coenzimelor

Theorell și Chance au dedus primii mecanismul aproximativ al acțiunii alcool-dehidrogenazei din ficat. Aspectul cel mai important al acestui mecanism este acela că nu se formează un complex binar enzimă (E)-substrat, viteza de transfer a H fiind atât de rapidă (100 sec^{-1}) încât viteza limită a procesului catalitic global și viteza de disociere a complexelor E-NADH și E-NAD limitează procesul invers:



Ecuția vitezei de reacție este:

$$\frac{[E_T]}{v_f} = \frac{1}{k_3} + \frac{1}{k_1[\text{NAD}]} + \frac{1}{k_2[\text{H}-\text{C}-\text{OH}]} + \frac{k_{-1}}{k_1 k_2 [\text{NAD}] [\text{H}-\text{C}-\text{OH}]}$$

K_1 (constanta de echilibru) este de aproximativ 10^{-5} M
 $(k_1 \approx 10^7 \text{ M}^{-1} \text{ sec}^{-1}; k_{-1} \approx 100 \text{ sec}^{-1})$ pe când $k_3 \approx 10^{-7} \text{ M}$
 $(k_{-3} \approx 10^7 \text{ M}^{-1} \text{ sec}^{-1}; k_3 \approx 1 \text{ sec}^{-1})$

Toate studiile ulterioare au arătat că acest mecanism este un caz special al unui mecanism mai general aplicabil la majoritatea dehidrogenazelor.

Complexul ternar de forma $E \begin{matrix} \nearrow \text{NAD} \\ \searrow \text{C=O} \end{matrix}$ include ambele substanțe și substrat analoage (inhibitori), fiind extrem de stabil și în consecință având caracter inhibitor puternic.

Studiile cu raze X ale complexului E-NAD-piruvat al lactatdehidrogenazei arată că regiunea coenzimei legate, care interacționează cu solventul mai rapid decât enzima corespunde părții majoritare a restului de adenină (conținând gruparea NH_2 exociclică, atomii de N 1 și 7 și atomii de C 5, 6, 8). Acesta este de fapt centrul favorabil pentru complexare. Pe de altă parte, centrul care leagă NAD într-o serie de dehidrogenaze sunt omologii care pot fi găsiți în toate structurile adenin-nucleotidelor legate de enzime (ca de exemplu, kinazele).

III.6. Metode de imobilizare a coenzimelor

Imobilizarea coenzimelor a atras atenția cercetătorilor datorită posibilităților lor de aplicare:

- în calitate de „coenzime active imobilizate”;
- ca liganzi imobilizați pentru cromatografia de afinitate;
- în studii enzimologice.

Dintre aceste aplicații, în cele ce urmează se vor trata aspecte legate de posibilitățile de utilizare a coenzimelor imobilizate în enzimologie. Aplicații metodologice s-au făcut în general pentru adenin-nucleotide (NAD^+ , NADP^+ , ATP, ADP), modul de lucru putând fi extins și la alte tipuri de coenzime.

Ca și în cazul enzimelor, înainte de imobilizare se urmărește o preactivare a suportului cu grupări reactive, capabile de a fixa coenzima, dar și o preactivare a coenzimei.

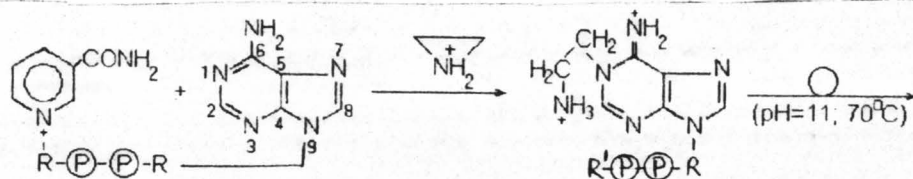
Primele imobilizări ale NAD au fost făcute pe perle de sticlă

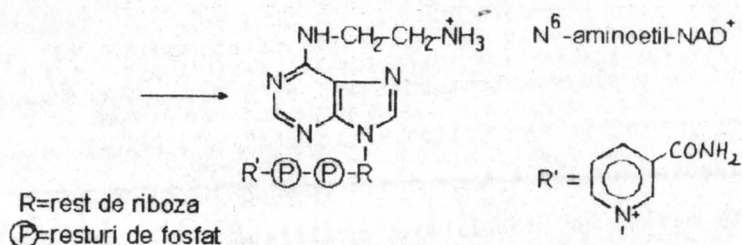
poroasă, prin intermediul sărurilor de diazoniu. Utilizând metoda chimică de cuplare suport-coenzimă prin intermediul unei s-triazine cu grupa NH_2 exociclică a restului de adenină, s-a explicat desprinderea acid-catalizată a coenzimei de pe suprafața sticlei. Această metodă de imobilizare, utilizată în cromatografia de afinitate nu este aplicabilă pe scară industrială, datorită instabilității legăturii suport-coenzimă.

Mosbach a cuplat NAD pe caproil-Sepharoză în prezența unei carbodiimide, dar activitatea coenzimei imobilizate a scăzut la 0,2% din cea a cofactorului nativ.

Wyk, Dunnill și Lilly au propus o metodă de obținere a unui NAD macromolecular solubil, cu activitate ridicată, prin tratarea NAD cu anhidridă succinică. Se formează succinil-riboză, succinil-adenină sau ambele. Preparatul prezintă o activitate remanentă de 67% față de cea a NAD nativ. Succinil-NAD este apoi cuplat cu polietilen-imină în prezența unei carbodiimide solubile, obținându-se polietileniminosuccinil-NAD, cu aproape aceeași activitate ca și a NAD libere. Din nefericire legătura de tip succinil-NAD se rupe la $\text{pH} > 7$, ceea ce limitează aplicabilitatea acestui preparat.

Windmueller și Kaplan au arătat că NAD amino-alkilat cu aziridină la N-1 din nucleul adeninic, se transpune în mediu bazic ($\text{pH} = 11$) la 70°C (transpoziție Dielsroth), rezultând N^6 -hidroxi-etil-NAD, cu o excelentă activitate.



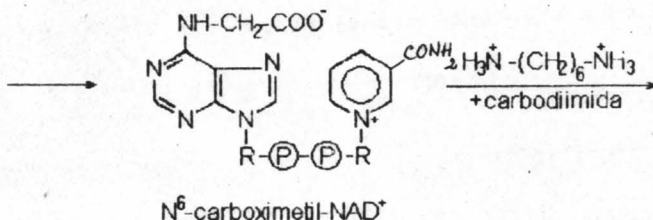
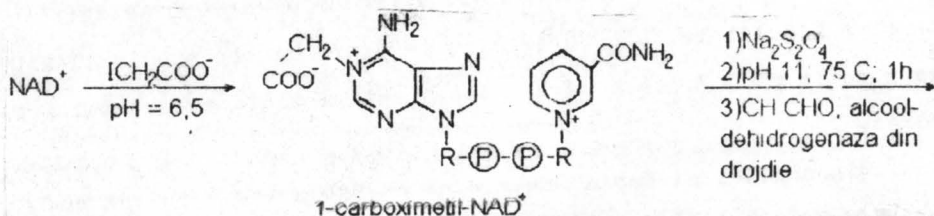


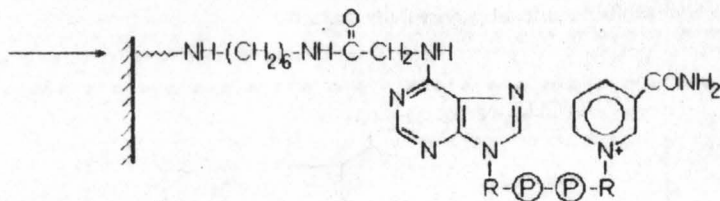
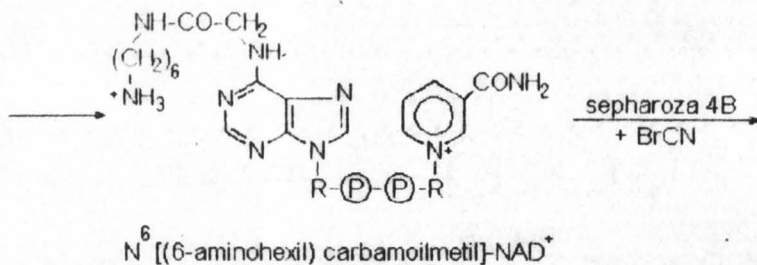
Cele două strategii de alchilare (cu anhidrida succinică și cu aziridină) introduc în molecula NAD două grupe reactive: $-\text{COOH}$ (electrofilă) și respectiv $-\text{NH}_2$ (nucleofilă) cu reactivitate superioară oricărei grupe existente în coenzimele native.

Astfel, N^6 -aminoetil-NAD(H) poate fi cuplat ușor (cu ajutorul unei carbodiimine) cu caproil-dextranul, pentru a se obține o coenzimă macromoleculară cu masa moleculară aproximativ 50.000.

Materialul astfel obținut se poate folosi în reactoare cu „Hollow-fiber” și în cele cu membrană.

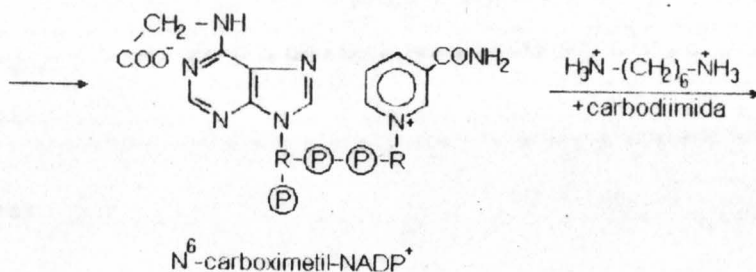
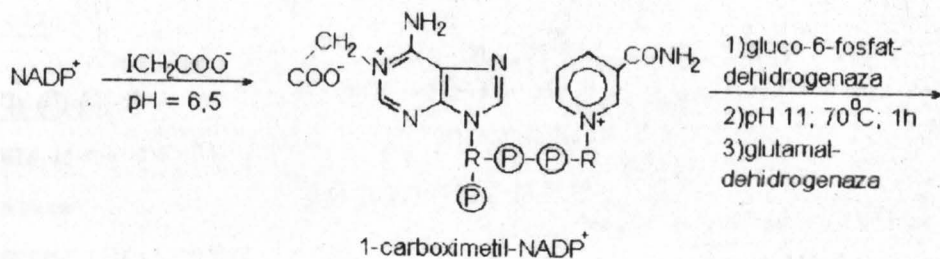
Printr-o metodă analogă, Mosbach și colaboratorii au sintetizat N^6 -carboximetil-NAD⁺, folosind iod-acetat și transpoziția Dimroth:

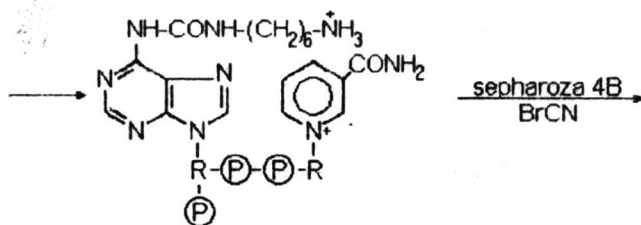




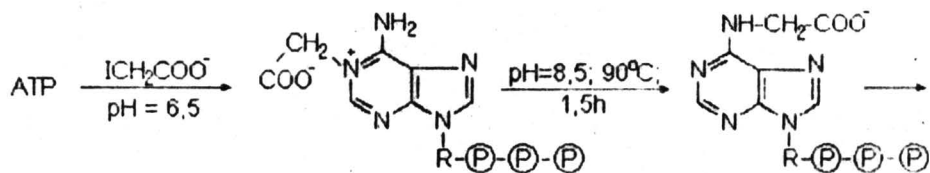
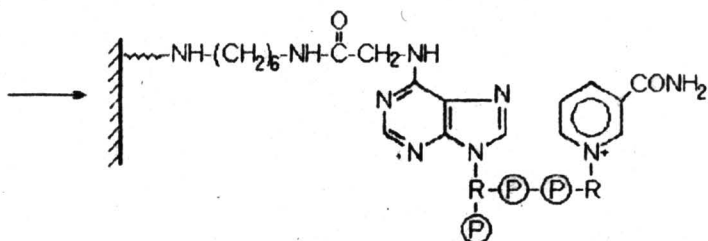
(P)-resturi de acid fosforic

Această metodă generală poate fi extinsă și pentru imobilizarea altor adenil-nucleotide:



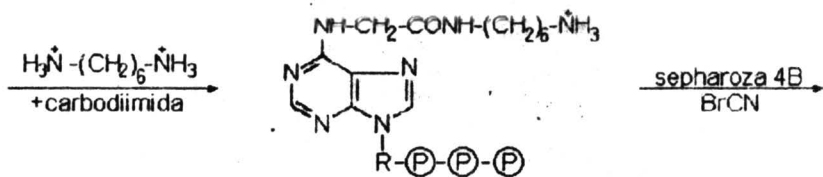


N^6 -[(6-aminohexyl)carbamoylmethyl]-NADP⁺

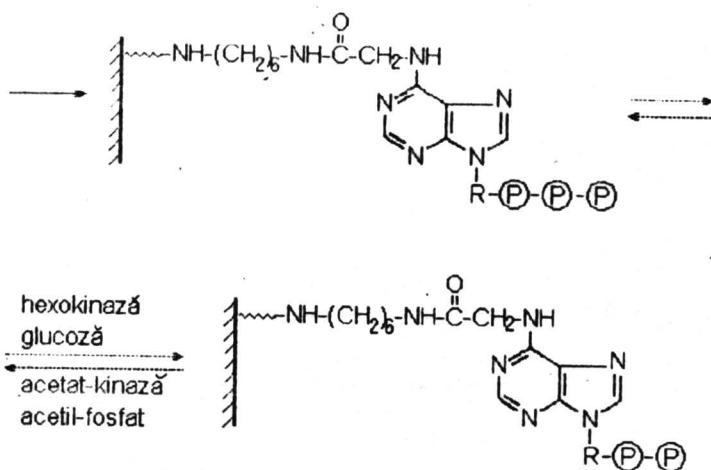


1-carboxymethyl-ATP

N^6 -carboxymethyl-ATP



N^6 -[(6-aminohexyl)carbamoylmethyl]-ATP



Toți derivații obținuți de la NAD(H), atât prin introducerea de grupări -COOH, cât și -NH₂ și imobilizați pe Sepharoză 4B pot fi utilizați pentru separarea dehidrogenazelor prin cromatografie de afinitate. Kaplan și colaboratorii au preparat derivați substituiți la C-8 ai NAD(H) și AMP, care au proprietatea de a transporta grupări NH₂. Metoda generală se bazează pe bromurarea adeninei, iar derivații obținuți se folosesc de asemenea în cromatografia de afinitate.

În urma unui studiu critic al metodelor de legare chimică a NAD pe agaroză și pe alte suporturi, Barry și O'Carra au ajuns la concluzia că reactivul de spațiere și nu ligandul (coenzima) ca atare poate oferi majoritatea variantelor de legare pentru hidrogenaze, chiar și dacă „spacer”-ul rezultat din acest reactiv este atașat de alte zone din coenzimă în afară de restul de adenină.

Importanța majoră a utilizării coenzimelor modificate constă în aceea că activitatea acestora este aproape identică sau foarte puțin diferită de cea a cofactorilor liberi, nativi.

În tabelul nr. 27 se dau câteva exemple care ilustrează acest lucru.

Tabelul nr. 27

Activitatea coenzimatică a unor analogi ai NAD^+

Enzima	Viteza de reducere a		
	$N^6-R'-NAD^+(\times)$	$N^6-R''-NAD^+(\times \times)$	$N^6-R'''-NAD^+$ -suport
Alcool-dehidrogenaza (din ficat)	55	100	-
Lactat-dehidrogenaza (din inimă de bou)	65	50	-
Malat-dehidrogenaza	75	75	-
Alcool-dehidrogenaza (din drojdie)	-	61	16 (Dextran T ₁₀) 0,7 (Seph- roză 4B)

($\times$) R' = carboximetil; ($\times \times$) R'' = (6-aminohexil)carbamoilmetil

III.7. Exemple de aplicare a enzimelor și coenzimelor
co-imobilizate

Posibilitatea co-imobilizării enzimelor și cofactorilor co-
responsabili pe același suport oferă o soluție economică și ele-
gantă pentru efectuarea unor reacții enzimatică, cu perspective
de recuperare și regenerare a coenzimelor necesare acestor trans-
formări.

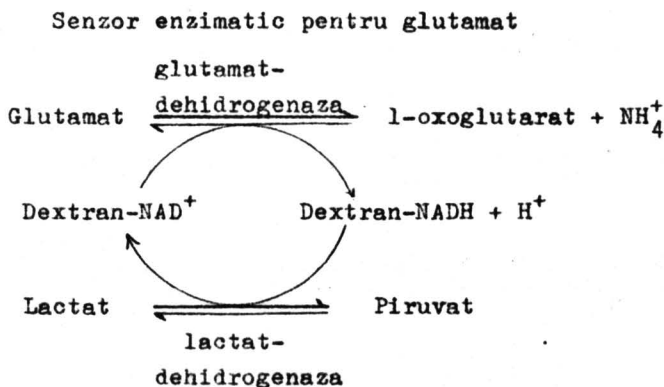
III.7.1. Senzori enzimatici

Enzimele și co-enzimele se pot co-imobiliza pe o membrană, care
cuplată cu un electrod ion-selectiv formează un senzor enzimatic

utilizat la determinarea concentrațiilor unor metaboliți în condiții în care mediul de analizat nu suferă nici o perturbare. Se pot doza astfel metaboliți în fluide fiziologice „in vivo”.

De exemplu, incluzând într-un gel de dextran activat NAD^+ , lactat-dehidrogenaza și glutamat-dehidrogenaza, se poate determina cu ajutorul unui senzor enzimatic concentrația de glutamat, prin măsurarea concentrației ionilor de NH_4^+ rezultați, cu ajutorul unui electrod specific (fig.Nr. 34).

Fig. Nr. 34



De asemenea electrodul cu lactat-dehidrogenază/glutamat-dehidrogenază se poate folosi pentru determinarea concentrațiilor de piruvat.

Electrodul enzimatic se prepară prân includerea într-o membrană de dializă a lactat-dehidrogenazei din muschi de iepure, a glutamat-dehidrogenazei solubile și a NAD^+ legată de dextran. Membrana este apoi înfășurată în jurul bulbului unui electrod de sticlă pentru NH_4^+ . Ca electrod de referință se folosește un electrod standard de calomel.

III.7.2. Reactoare enzimatice cu cofactori imobilizați

Dat fiindcă imobilizarea oferă posibilitatea regenerării coenzimelor, preparatele cu cofactori imobilizați se pot folosi în reactoare, pentru reacții de dehidrogenare-hidrogenare.

Un asemenea reactor poate fi folosit la producerea de alanină din piruvat, prin acțiunea alanin-dehidrogenazei. În fig.Nr.35 sunt reprezentate două scheme:

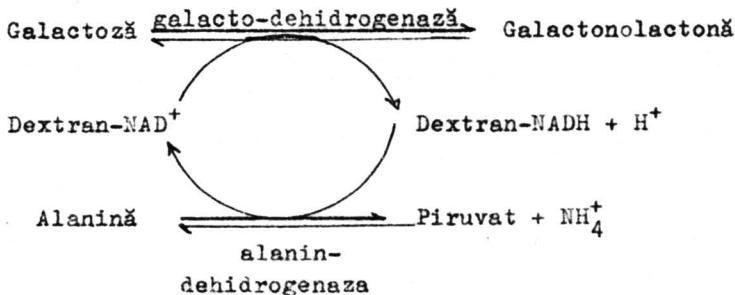
a) cu galacto-dehidrogenază și

b) cu lactat-dehidrogenază, ambele utilizând NADH imobilizată pe dextran.

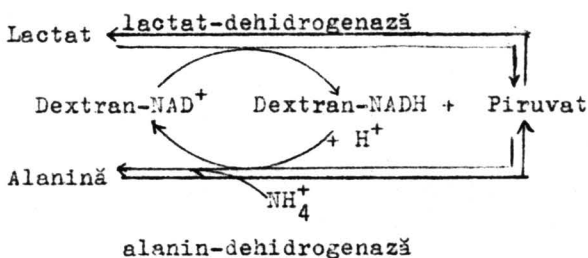
Fig. Nr. 35

Reactoare pentru obținerea L-alaninei

Varianta a)



Varianta b)



Se folosește un reactor cu membrană de ultrafiltrare. Cele două enzime, împreună cu NAD^+ imobilizat pe dextran, se introduc în soluția tamponată a substratelor și se plasează în rezervorul aparatului. Ultrafiltrarea se face la o presiune de 40-50 psi (debit aproximativ 9 ml/h), în așa fel încât volumul de lichid în compartimentul de ultrafiltrare să rămână pe toată durata experimentului la 2 ml. Filtratul se colectează în porțiuni de câte 5 ml.

Reactorul cu galactodehidrogenază/alanin-dehidrogenază convertește 30% din piruvatul utilizat la alanină, cu viteză constantă, timp de 6,5 h, în timp ce în reactorul cu lactat-dehidrogenază/alanin-dehidrogenază, randamentul conversiei, inițial de 60-70% scade la 20% după 5,5 h. NAD^+ imobilizat se recirculă cu viteze de 14 timpi/h și respectiv 33 timpi/h, ceea ce arată că în aceste reactoare NAD^+ imobilizat este steric abordabil pentru enzime. Ajustând concentrațiile de enzime și de NAD^+ imobilizat pe dextran ca și debitul de ultrafiltrare din reactor, se poate realiza o conversie la produsul de reacție apropiată de 100%.

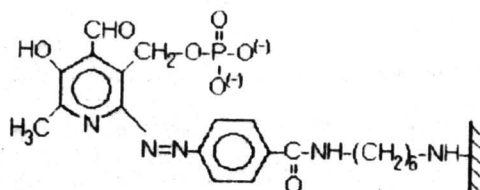
III.8. Alte exemple de coenzime imobilizate

În afară de adenin-nucleotidele analoage amintite până acum, se mai pot imobiliza și alți cofactori.

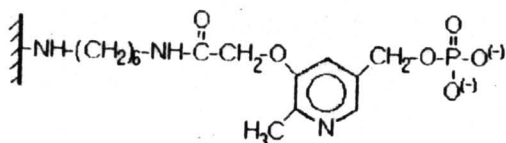
- Astfel, flavin-mononucleotida (FMN) s-a cuplat pe hexanoil-Sepharoză cu DCC în piridină apoasă, printr-un procedeu analog cu cel descris la obținerea hexanoil- NAD^+ -Sepharezei și care constă în cuplarea NAD^+ pe Sepharoză substituită cu acid ϵ -aminocaproic. FMN astfel imobilizată leagă luciferaza bacteriană, iar prin reducere catalitică cu H_2 sau cu ditionit, devine un substrat eficient în reacțiile de luminiscentă.

- Piridoxal-5'-fosfatul care catalizează scindarea triptofanului, se poate imobiliza în trei feluri:

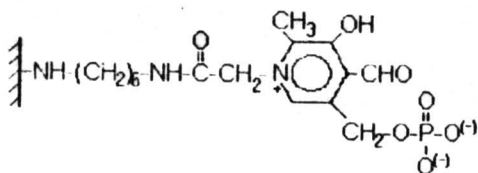
A) - prin cuplare cu p-amino-benzamidohexil-Sepharoză diazotată:



B) - prin cuplare la gruparea fenolică:



C) - prin cuplare la atomul de azot din heterociclu:



În cazurile B) și C) imobilizarea are loc prin reacția piridoxal-5'-fosfatului cu un bromacetil-derivat al Sepharozei, în DMF 50%, la pH = 6, la temperatura camerei, timp de aproximativ 70 h.

Activitatea catalitică a acestor preparate a fost testată la reacția de scindare neenzimatică a triptofanului.

Metoda A) se poate folosi și la imobilizarea enzimelor, deoarece piridoxal-5'-fosfatul imobilizat își păstrează grupele funcționale reactive, capabile de a lega apoproteinele enzimelor

dependente de B_6 . Astfel, complexul 5'-piridoxal-fosfat-Sepharoză-apotriptofanaza se reduce cu NaBH_4 conducând la un derivat ce prezintă 60% din activitatea catalitică a triptofanazei libere.

Imobilizatul obținut prin metoda B) în care gruparea OH fenolică a piridoxal-5'-fosfatului este blocată prezintă o activitate foarte scăzută.

În cazul imobilizatului C) se observă o activitate apreciabilă. Comportarea net diferită a celor două preparate se explică prin aceea că deși imobilizatul C) are o afinitate mult mai redusă pentru apoproteină (prin blocarea atomului de azot heterociclic), posedă totuși gruparea fenolică OH liberă, mult mai reactivă.

Din cele arătate până acum, se poate trage concluzia că preparatele cu coenzime imobilizate trebuie să îndeplinească în principal două condiții: o retenție bună și o capacitate ridicată de regenerare. Regenerarea se poate face pe cale chimică (cu donori sau acceptori de protoni) sau electrochimică, ca și în cazul enzimelor imobilizate. Preparatele de enzime și coenzime co-imobilizate se pot folosi în diverse moduri, în funcție de scopul pentru care sunt obținute. Astfel, pentru suplinirea unor deficiențe enzimatice ale organismului se pot folosi sub formă inclusă în microcapsule sau în perle de polimer, în dispozitive extracorporale sau „in vivo” etc. Preparatele macromoleculare de tip „hollow-fibers” sunt cele mai indicate pentru imobilizarea eficientă a NAD^+ nemodificat. Membranele obținute astfel trebuie să rețină eficient NAD^+ imobilizat, dar să fie permeabile pentru substrat și produsul de reacție. Tot în scopul unei bune retenții se mai poate folosi și metoda cuplării pe suport a complexului preformat enzimă-coenzimă.

LISTA DE ABREVIERI

ADH = alcool-dehidrogenaza

Amberlite IRA = rășină schimbătoare de ioni (policondensat)
acidă

Amberlite IRC = rășină schimbătoare de ioni (policondensat)
bazică

ADP = adenzin-difosfat

AMP = adenzin-monofosfat

ATP = adenzin-trifosfat

BAEE = ester etilic al N-benzoilargininei

CM = carboximetil

CoA-SH = coenzima A

CoA-S-COCH₃ = acetil-coenzima A

Compus S-Reichstein = 11-dezoxicoortizol

DCC = dicitlohexilcarbodiimida

DEAE = dietil-aminoetil

Dowex 50 = rășină polistirenică acidă, cu grupe Ph-SO₃H
(Ph = fenil)

Dowex 1 = rășină polistirenică bazică, cu grupe
 $\text{Ph}-\text{CH}_2-\overset{+}{\text{N}}(\text{CH}_3)_3$

ECTOLA-celuloză = amestec de celuloze aminate (schimbător
de ioni bazic)

EDTA = acid etilendiaminotetraacetic

FAD = flavin-adenin-dinucleotidă

GMP = guanozin-monofosfat

IgG = imunoglobulină G

IMP = inozin-monofosfat

NAD = coenzima I (fără specificarea formei reduse sau

NAD^+ = nicotinamid-adenin-dinucleotida (coenzima I)

NADH = nicotinamid-adenin-dinucleotida forma redusă

NADP = nicotinamid-adenin-dinucleotid fosfat (coenzima II)
fără specificarea formei reduse sau oxidate

NADP^+ = nicotinamid-adenin-dinucleotid fosfat (coenzima II)

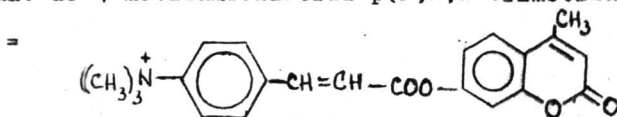
NADPH = coenzima II forma redusă

TEAE = trietilaminoetil

TRIS = 1-tris (hidroximetil)aminometan

TAME = ester metil al N-acetil-tirozinei

Cinamat de 4-metilumbeliferil-p(N,N,N-trimetilamoniu) =



VERIFICAT
2017

VERIFICAT
2007

**Tiparul s-a efectuat sub c-da nr. 181/1995
la Tipografia Editurii Universității București**

ELENA POPA

BIOCATALIZATORI IMOBILIZAȚI

VOLUMUL I

**EDITURA UNIVERSITĂȚII DIN BUCUREȘTI
- 1 9 9 6 -**

